

Technische Universität München

Chirurgische Klinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar
der Technischen Universität München

Komm. Direktor: Univ.-Prof. Dr. J. H. Kleeff

Die Charakterisierung von perineuralen Entzündungszellsubtypen in der pankreatischen Neuritis in der chronischen Pankreatitis und im duktalem Adenokarzinom des Pankreas

Stephan Schorn

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. G. O. Ceyhan
2. Univ.-Prof. Dr. J. H. Kleeff

Die Dissertation wurde am 28.08.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.03.2015 angenommen.

Die Ergebnisse der vorgelegten Dissertation wurden in dem wissenschaftlichen Peer-Reviewed-Journal Plos One unter folgendem Titel

„Perineural Mast Cells Are Specifically Enriched in Pancreatic Neuritis and Neuropathic Pain in Pancreatic Cancer and Chronic Pancreatitis”

eingereicht und publiziert.

Gewidmet in Liebe und Dankbarkeit meiner Familie.

Inhalt

1. Einleitung	6
1.1 Das Pankreaskarzinom	6
1.2 Chronische Pankreatitis	10
1.3 Pankreatische Neuropathie und Schmerzen.....	14
1.3.1 Pankreatische Neuritis und Schmerz im duktalem Adenokarzinom und in der chronischen Pankreatitis	14
1.3.2 Pankreatische Neuroplastizität und Schmerz im duktalem Adenokarzinom und in der chronischen Pankreatitis	17
1.3.3 Neurale Invasion und Schmerzen	18
2. Ziel der Studie	21
3. Material und Methoden	23
3.1 Reagenzien	23
3.2 Antikörper.....	24
3.3 Geräte	25
3.4 Patienten und Gewebe	25
3.5 Abdominale Schmerzen.....	26
3.6 Immunhistologie und Doppel-Immunfluoreszenz-Färbung	26
3.7 Quantitative Analyse der Immunzellenverteilung	28
3.8 Real-Time LightCycler® Quantitative-Polymerase-Chain-Reaction (QRT-PCR)	28
3.9 Bestimmung und Auswertung der neuralen Immunreaktivität von PAR-1 und PAR-2. 30	
3.10 Statistische Auswertung und Analyse	30
4. Ergebnisse	32
4.1 Zytotoxische T-Zellen, Makrophagen und Mastzellen sind die vorherrschenden Entzündungszellen der pankreatischen Neuritis im duktalem Adenokarzinom des Pankreas und der chronischen Pankreatitis	32
4.1.1. Pankreaskarzinom.....	32
4.1.2 Chronische Pankreatitis	35

4.2 Der Anteil an Mastzellen in der pankreatischen Neuritis korreliert mit neuropathischen Schmerzen im Pankreaskarzinom.....	37
4.3 Der Anteil an Mastzellen an der pankreatischen Neuritis korreliert mit neuropathischen Schmerzen bei Patienten mit chronischer Pankreatitis.	43
4.4 Die neurale Invasion von Karzinomzellen im Pankreaskarzinom korreliert nicht mit der neuralen Infiltration von Mastzellen.....	48
4.5 Die Protease-Aktivierten-Rezeptoren PAR-1 und PAR-2 haben keinen Einfluss auf die neuropathischen Schmerzen in der chronischen Pankreatitis und im Pankreaskarzinom. ...	49
4.6 Mastzellen in Patienten mit Pankreaskarzinom/chronischer Pankreatitis und neuropathischen Schmerzsyndrom enthalten Tryptase und Chymase.....	53
5. Diskussion	59
6. Zusammenfassung und Schlussfolgerung	68
7. Quellenverzeichnis	70
8. Lebenslauf	79
9. Danksagung	80

1. Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Das duktale Adenokarzinom (PCa) ist mit über 80% der häufigste im Pankreas vorkommende Tumor (Morohoshi, Held et al. 1983, Warshaw and Fernandez-del Castillo 1992, Ghaneh, Costello et al. 2008). Mit einer Inzidenz von knapp 44.000 Fällen rangierte das Pankreaskarzinom im Jahr 2012 hinter Leukämien auf Platz 10 der häufigsten Krebsneuerkrankungen in den USA (Siegel, Naishadham et al. 2012). Der Anzahl an Neuerkrankungen steht mit ca. 38.000 eine nur etwas geringere Anzahl an Todesfällen gegenüber. Damit reiht sich die Erkrankung hinter Lungen-/Bronchus-, Prostata-, Brust- und Dick-/Enddarmkarzinomen an 4. Stelle der durch Tumore verursachten Todesursachen ein. Im Gegensatz zu deren Mortalitäten, welche über die Jahre gesehen rückläufig sind, konnte beim Pankreaskarzinom bislang kein Durchbruch mit einem entsprechenden Rückgang der Mortalität erzielt werden (Siegel, Naishadham et al. 2012).

Als Risikofaktoren für die Entstehung des Karzinoms konnten in diversen Studien bislang erhöhtes Lebensalter, Rauchen (Fuchs, Colditz et al. 1996, Coughlin, Calle et al. 2000), ein erhöhter Body-Mass-Index (Michaud, Giovannucci et al. 2001, Berrington de Gonzalez, Sweetland et al. 2003), Diabetes mellitus (Everhart and Wright 1995, Gapstur, Gann et al. 2000, Chari, Leibson et al. 2005) sowie chronische (Howes and Neoptolemos 2002, Malka, Hammel et al. 2002) und hereditäre (Howes, Lerch et al. 2004) Pankreatitis identifiziert werden. Ebenso gehen Mutationen in den Tumorsuppressorgenen INK4A, BRCA2 und LKB1, dem DNA-Mismatch-Repair-Gen MLH1 und dem kationischen Trypsinogen-Gen PRSS1 (Whitcomb, Gorry et al. 1996, Jaffee, Hruban et al. 2002, Hezel, Kimmelman et al. 2006) mit einem erhöhten Risiko einher, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken.

Mit 65% sind die Tumore mehrheitlich im Pankreaskopf lokalisiert. Tumore im Pankreaskörper (15%), im Pankreasschwanz (10%) oder ein multifokales Auftreten (10%) sind dagegen seltener anzutreffen (Ghaneh, Costello et al. 2008). Prognostisch haben die Neoplasien des Pankreaskopfes etwas bessere Aussichten, da diese eine nähere Beziehung zu den Gallenwegen aufweisen und früher durch

Schmerzen im Rücken- oder Bauchbereich oder durch eine obstruktive Klinik wie schmerzlose Gelbsucht oder akute Pankreatitis in Erscheinung treten (Li, Xie et al. 2004, Ghaneh, Costello et al. 2008). Die Geschwulste des Pankreaskörpers und des Pankreasschwanzes hingegen präsentieren sich auf Grund ihrer Symptomlosigkeit erst in einem relativ späten, meist schon sehr fortgeschrittenen Stadium mit einer infausten Prognose (Ghaneh, Costello et al. 2008).

Die 5-Jahres-Überlebensrate betrug 2012 im Durchschnitt nur 6% (Siegel, Naishadham et al. 2012). Bei genauer Betrachtung der Falldaten fällt auf, dass eine extrem hohe Anzahl an Karzinomen erst dann diagnostiziert wird, wenn sie entweder bereits metastasiert (53%) oder regional weit fortgeschritten (27%) sind. Lediglich 8% aller Tumore der Bauchspeicheldrüse fallen in einem lokalen, kontrollierbaren Stadium auf und weisen eine entsprechend günstigere Prognose im Langzeitüberleben auf (Siegel, Naishadham et al. 2012). Der Vergleich der 5-Jahres-Überlebensraten der frühen Stadien der Erkrankung (22%) mit denen der lokal fortgeschrittenen Stadien (9%) oder von bereits metastasierten Tumoren (2%) zeigt, welchen Stellenwert eine effiziente Früherkennung in der Prognose der Erkrankung einnimmt. Hierbei hat sich unter den nicht-invasiven Untersuchungstechniken die Kontrastmittel unterstützte computertomographische (CT)-Bildgebung im klinischen Alltag gegenüber anderen Untersuchungsmethoden wie der endoskopischen retrograden Cholangiopankreatographie (ERCP) durchgesetzt (Nishiharu, Yamashita et al. 1999, Catalano, Laghi et al. 2003, Minniti, Bruno et al. 2003, Li, Xie et al. 2004, Ghaneh, Costello et al. 2008). Zusätzlich zu einer hohen Sensitivität und Spezifität bei der Entdeckung des Tumors (Catalano, Laghi et al. 2003, Minniti, Bruno et al. 2003) liefert die CT darüber hinaus eine gute Einschätzung der Resektabilität (Nishiharu, Yamashita et al. 1999, Catalano, Laghi et al. 2003, Minniti, Bruno et al. 2003, Phoa, Tilleman et al. 2005, Dewitt, Devereaux et al. 2006). Eine bessere Erkennung, insbesondere von unklaren oder kleineren Raumforderungen, liefert der endoskopische Ultraschall (EUS), welcher über den Aspekt der Bildgebung hinaus bei Bedarf auch für den Gewinn von Gewebeproben durch Feinnadelaspiration (FNA) erweitert werden kann und diesbezüglich dem rein bildgebenden Charakter einer Kontrastmittel gestützten CT überlegen ist (Di Stasi, Lencioni et al. 1998, Gress, Gottlieb et al. 2001, Agarwal, Abu-Hamda et al. 2004, Dewitt, Devereaux et al. 2006). Die endoskopische retrograde Cholangiopankreatographie (ERCP) hat inzwischen als diagnostische Bildgebung auf Grund der Weiterentwicklung von EUS und der Magnetresonanztomographie

(MRCP) an Stellenwert verloren und sollte nur noch im Rahmen von Gewebebegewinnung und zur Entlastung eines Verschlussikterus durch Stents eingesetzt werden (Ghaneh, Costello et al. 2008). Zusätzlich zur bildgebenden Diagnostik steht mit dem Carbohydrate-Antigen (CA) 19-9 ein Tumormarker mit einer mittleren Sensitivität von 79% und einer mittleren Spezifität von 82% zur Diagnostik wie auch zur Verlaufskontrolle zur Verfügung (Warshaw and Fernandez-del Castillo 1992, Goonetilleke and Siriwardena 2007, Ghaneh, Costello et al. 2008).

Entscheidend für eine günstige Prognose ist neben der adäquaten Früherkennung auch die vollständige Entfernung des Tumors (Wagner, Redaelli et al. 2004, Riediger, Makowiec et al. 2006). Vor allem die Abwesenheit einer Tumordinfiltration in die obere Mesenterialarterie, in den Coeliacalplexus sowie das Nichtvorhandensein von Fernmetastasen sind für eine kurative, operative Entfernung ausschlaggebend (Alexakis, Halloran et al. 2004, Li, Xie et al. 2004, Ghaneh, Costello et al. 2008, Loos, Kleeff et al. 2008). Dagegen stellt eine Infiltration des oberen Mesenterialvenen-/ Konfluenzbereichs keine Kontraindikation für eine operative Therapie dar (Alexakis, Halloran et al. 2004, Tseng, Raut et al. 2004, Loos, Kleeff et al. 2008). Insgesamt kommt eine Operation nur für eine Minderheit von Patienten (10-20%) in Frage (Sener, Fremgen et al. 1999, Li, Xie et al. 2004, Loos, Kleeff et al. 2008).

Operationstechnisch wird bei der Entfernung des Tumors heutzutage meist die Pylorus erhaltende, partielle Pankreatikoduodenektomie nach Kausch-Whipple durchgeführt (Lin and Lin 1999, Seiler, Wagner et al. 2000, Tran, Smeenk et al. 2004, Seiler, Wagner et al. 2005). Ziel des Eingriffes ist es, den Tumor vollständig mit einem ausreichenden Abstand zum gesunden Gewebe (R0-Resektion) zu entfernen, da dies essentiell für eine günstige Prognose des Patienten ist (Wagner, Redaelli et al. 2004, Riediger, Makowiec et al. 2006). Radikalere Operationstechniken, wie etwa eine vollständige Entfernung der Bauchspeicheldrüse oder eine radikale Entfernung von Lymphknoten, verbessern nicht die Mortalität der Patienten. Bei einem Vergleich der radikaleren Operationstechniken mit weniger radikaleren fällt dagegen auf, dass vor allem die radikaleren Operationen mit einer erhöhten Morbiditätsrate vergesellschaftet sind (Pedrazzoli, DiCarlo et al. 1998, Alexakis, Halloran et al. 2004, Farnell, Pearson et al. 2005).

Aber nicht nur aus chirurgischer Sicht ist die Behandlung des PCa eine anspruchsvolle Herausforderung. Die breite Resistenz gegenüber konventionellen Chemotherapeutika und gegenüber der Strahlentherapie vermindert ebenfalls die postoperative Prognose (Shore, Raraty et al. 2003) und sorgt für die ungewöhnlich hohe Mortalität dieser Erkrankung. In der adjuvanten Therapie hat sich wegen des günstigeren Nebenwirkungsprofils und der Verlängerung der Lebenszeit Gemcitabine gegenüber Fluorouracil durchgesetzt (Burris, Moore et al. 1997, Shore, Raraty et al. 2003, Oettle, Post et al. 2007). Die Durchführung einer Chemoradiotherapie scheint dagegen keinen Vorteil auf die Gesamtüberlebenszeit zu haben (Neoptolemos, Dunn et al. 2001, Neoptolemos, Stocken et al. 2004). Bei der Mehrzahl der Tumore, die entweder lokal soweit fortgeschritten sind, dass man sie nicht mehr operieren kann, oder bereits Tochtergeschwülste ausgebildet haben, wird eine kombinierte Chemotherapie aus Gemcitabine und Capecitabine oder einem platinhaltigen Chemotherapeutikum zusätzlich zu symptomlindernden Therapien angewandt (Ying, Zhu et al. 2012).

Neuere Studien von Conroy et al. zeigen, dass in der palliativen Situation eine Chemotherapie nach dem FOLFIRINOX (Fluoruracil, Leucovorin, Irinotecan und Oxaliplatin)-Schema im Vergleich zum konventionellen Gemcitabine-Schema hinsichtlich der Überlebensdauer vorteilhafter ist (Conroy, Desseigne et al. 2011, Ying, Zhu et al. 2012). Dieses Schema wird derzeit vor allem bei initial lokal fortgeschrittenen Tumoren oder bei Krebspatienten als 3rd-line Chemotherapie in einer palliativen Absicht gegeben.

Neben der fachgerechten Behandlung der Grunderkrankung spielen die Versorgung und Behandlung der durch den Tumor verursachten Beeinträchtigungen der Lebensqualität in der weiteren Patientenversorgung eine enorme Rolle. Im Vordergrund stehen Gewichtsverlust und Schmerzen. Zur Beherrschung der Tumorschmerzen ist oft eine hoch dosierte Opioidaufnahme erforderlich. Die Durchführung eines Plexus-Coeliacus-Blockes kann bei der Schmerzbekämpfung unterstützend wirken, ohne jedoch die Lebensqualität oder die Überlebenszeit signifikant zu verbessern (Brown, Bulley et al. 1987, Wong, Schroeder et al. 2004).

Gerade bei Raumforderungen im Kopf der Bauchspeicheldrüse kommt es nicht selten zu Einengungen oder Verschlüssen des Pankreas- oder Gallenganges (Li, Xie et al. 2004, Ghaneh, Costello et

al. 2008). Bei Verschlüssen oder Verengungen der Gallen- und Pankreaswege, welche charakteristisch für Tumorlokalisationen im Pankreaskopf sind, können durch den entsprechenden Sekretanstau schwere Beeinträchtigungen des Patientenalltags entstehen. Um entsprechende Einengungen oder gar Verschlüsse zu überbrücken, hat sich die Einlage von Metall- oder Plastikstents in Abhängigkeit von der Patientenkonstitution und Tumorausbreitung via ERCP bewährt (Prat, Chapat et al. 1998, Maire, Hammel et al. 2006, Ghaneh, Costello et al. 2008).

1.2 Chronische Pankreatitis

Klassischerweise unterscheidet man zwischen akuten und chronischen Entzündungen der Bauchspeicheldrüse. Den Unterschied machen vor allem ihre mögliche Reversibilität und die verschiedenen Ätiologien aus. Während Schädigungen des Parenchyms bei der akuten Form vollständig ausgeheilt werden können (Odaira, Berger et al. 1986, Sarles, Bernard et al. 1989, Gupta and Toskes 2005, Braganza, Lee et al. 2011), ist die chronische Pankreatitis (CP) durch einen irreversiblen Gewebeverlust mit einem bindegewebigen Umbau des ganzen Pankreasparenchyms charakterisiert (Sarles, Bernard et al. 1989, Gupta and Toskes 2005, Braganza, Lee et al. 2011). Neuere Thesen (Whitcomb 2004, Braganza, Lee et al. 2011) gehen von einem Krankheitsspektrum von akuter Pankreatitis über rezidivierende akute Pankreatitiden bis hin zur CP aus.

Den Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer chronischen Bauchspeicheldrüsenentzündung bildet die regelmäßige Einnahme von Alkohol (Pezzilli 2009, Yadav, Hawes et al. 2009). So weist in Industrieländern ein Großteil der Patienten mit CP einen überdurchschnittlich hohen Alkoholkonsum auf (Dufour and Adamson 2003, Pezzilli 2009). Die Tatsache, dass jedoch nur eine geringe Anzahl von Patienten mit Alkoholabusus eine CP entwickelt, legt den Verdacht nahe, dass dem Alkoholmissbrauch eine Schlüsselposition zukommt, dass jedoch auch andere Faktoren eine bedeutsame Rolle spielen (Dufour and Adamson 2003, Braganza, Lee et al. 2011). Weitere Risikofaktoren, die im Zusammenhang mit Pankreatitis beobachtet wurden, sind Rauchen (Yadav, Hawes et al. 2009, Yadav and Whitcomb 2010), Hyperparathyreoidismus (Bai, Giefer et al. 2012), diverse Infektionen (Braganza, Lee et al. 2011) sowie Mutationen im Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) (Cohn 2005), im

kationischen Trypsinogen (protease-serine-1 gene, PRSS-1) (Whitcomb, Gorry et al. 1996) und im Serine Protease Inhibitor und Kazal type 1 (SPINK-1)-Gen. Aber auch Obstruktionen des Gallen- und Pankreasganges durch Narben, posttraumatische Strikturen oder Tumore können Ausgangspunkt einer chronischen Inflammation darstellen (Sarles 1986, Sarles, Bernard et al. 1989, Braganza, Lee et al. 2011).

Pathophysiologisch spielen insbesondere zwei Faktoren eine dominante Rolle:

Zum einen werden Funktion und Sekretion der Azinuszellen gestört. Freie Sauerstoffradikale (ROS) induzieren die Produktion und Absonderung von Chemokinen und Cytokinen und verstärken damit die bestehende Entzündung (Dabrowski, Boguslowicz et al. 2000, Pandol and Raraty 2007, Gaisano and Gorelick 2009, Leung and Chan 2009, Braganza, Lee et al. 2011). Zusätzlich kommt es zu einer intrazellulären Aktivierung von Proteasen sowie zu einer pathologischen basolateralen Sekretion (Gaisano and Gorelick 2009, Braganza, Lee et al. 2011), bei welcher die physiologische apikale Sekretion gemindert ist (Gaisano and Gorelick 2009, Braganza, Lee et al. 2011).

Des Weiteren ist die Zusammensetzung des Pankreassekrets verändert, so dass vermehrt Proteine ausgefällt werden und somit Vorläufer von Konkrementen gebildet werden (Sarles 1986, Sarles, Bernard et al. 1989). Bei Untersuchungen des Pankreassekrets konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von Enzymen und Kalzium zunimmt, wohingegen die Menge an Serine Protease Inhibitor und Kazal type 1 (SPINK-1), Bicarbonat und Citrat abnimmt (Sarles 1986, Sarles, Bernard et al. 1989, Braganza, Lee et al. 2011). Daneben tauchen auf Grund von radikalen Sauerstoffspezien das Pankreatitis-Assoziierte-Protein [PAP]/regIII und das Pankreas-Stone-Protein (PSP) auf (Sarles 1986, Sarles, Bernard et al. 1989, Braganza, Lee et al. 2011).

Zur Pathogenese der CP existieren mehrere Hypothesen. So sieht ein Erklärungsversuch die im Bauchspeicheldrüsengang vorkommenden kalzifizierten Proteinausfällungen, bestehend aus Pankreatitis-Assoziierten-Protein [PAP]/regIII und dem Pankreas-Stone-Protein (PSP) als Ursache der Erkrankung (Sarles 1986, Sarles, Bernard et al. 1989).

Andere wissenschaftliche Erklärungen für die Entstehung der CP fokussieren sich auf die Azinuszellen der Bauchspeicheldrüse. Die bei Alkoholmetabolismus anfallenden Fettsäureethylester stehen im Verdacht, durch Störungen der Kalziumhomöostase in Azinuszellen eine Bauchspeicheldrüsenentzündung auslösen zu können (Pandol and Raraty 2007). Entsprechend ihrer Ätiologie kann man die CP in eine alkoholische, eine toxische, eine idiopathische/tropische, eine autoimmune und eine hereditäre Form unterteilen (Gupta and Toskes 2005, Pezzilli 2009, Braganza, Lee et al. 2011). Da für diese Dissertation nur Gewebeproben von Patienten mit CP alkoholischer Genese untersucht wurden, wird im Folgenden kurz auf die alkoholische CP eingegangen.

Die Mehrheit der Patienten mit CP weist in ihrer Krankheitsgeschichte einen exzessiven Alkoholkonsum auf (Dufour and Adamson 2003, Pezzilli 2009). Den Altersgipfel der Krankheit stellen dabei Menschen im 4. Lebensjahrzehnt dar (Mullhaupt, Truninger et al. 2005). Charakteristisch für die alkoholinduzierte CP sind kalzifizierte Ablagerungen in den Gängen der Bauchspeicheldrüse (Sarles, Bernard et al. 1989). Typische Symptome der Patienten sind Schmerzen, Diabetes und Störungen der enzymatischen Spaltung der Nahrung in Form von Fettstuhlgängen (Witt, Apte et al. 2007, Braganza, Lee et al. 2011).

Schmerzen treten früh bei diesem Krankheitsbild auf und stellen das Leitsymptom der Krankheit dar. Damit es im Verlauf der Erkrankung zur Einschränkung der Fettverdauung und konsekutiven Fettstühlen kommt, müssen jedoch über 90% der enzymbildenden Azinuszellen zerstört sein (Braganza, Lee et al. 2011). Mit der chronischen Bauchspeicheldrüsenentzündung geht zudem ein erhöhtes Risiko (<5%) für die Ausbildung eines Karzinoms einher (Malka, Hammel et al. 2002).

Über lange Zeit stellte die endoskopische retrograde Cholangiopankreatographie (ERCP) die Methode dar, um mit möglichst hoher Genauigkeit eine CP zu diagnostizieren (Gupta and Toskes 2005). Wegen des nicht zu vernachlässigenden Risikos, mittels einer ERCP selbst eine Pankreatitis hervorzurufen, ist diese als rein bildgebendes Mittel in den Hintergrund geraten und wird zunehmend durch die Magnetresonanz-Cholangiopankreatographie (MRCP) (Tamura, Ishibashi et al. 2006), durch den endoskopischen Ultraschall (EUS) (Kahl, Glasbrenner et al. 2002) und den Sekretin-Stimulations-Test ersetzt (Somogyi, Ross et al. 2003).

Die Haupttherapie der Krankheit richtet sich vor allem nach dem Beschwerdebild des Patienten und ist primär von symptomatischem Charakter. So werden Ausfälle der an Protein- und Fettverdauung beteiligten Enzyme durch eine entsprechende Enzymsubstitution korrigiert und somit therapiert (Gupta and Toskes 2005, Witt, Apte et al. 2007, Braganza, Lee et al. 2011). Blutzuckerentgleisungen wegen Diabetes mellitus, die durch Gewebeerstörung hervorgerufen wurde, werden mittels Insulintherapie behandelt (Witt, Apte et al. 2007, Braganza, Lee et al. 2011). Die Behandlung der Schmerzen gestaltet sich jedoch deutlich schwieriger. Basistherapie ist hierbei eine adäquate Einstellung mittels Analgetika nach dem WHO-Schema (Braganza, Lee et al. 2011). Darauf aufbauend stehen invasive Methoden, wie die chirurgische, durch CT oder Ultraschall gesteuerte Punktion und Entlastung von Pseudozysten ohne Verbindungen zu den Pankreasgängen, zur Verfügung (Rosso, Alexakis et al. 2003). Bei Gangobstruktionen, Strikturen und Steinen innerhalb des Pankreasganges haben sich die ERCP (Rosso, Alexakis et al. 2003) und bei größeren Gangerweiterungen die laterale Pankreatikojejunostomie (Friess, Berberat et al. 2002) zur Ursachenbeseitigung, Entlastung und Minderung der Schmerzen bewährt.

1.3 Pankreatische Neuropathie und Schmerzen

Schmerzen stellen sowohl beim PCa des Pankreas (Li, Xie et al. 2004, Ghaneh, Costello et al. 2008) wie auch bei der chronischen Entzündung der Bauchspeicheldrüse (Witt, Apte et al. 2007, Braganza, Lee et al. 2011) das Hauptsymptom dar. Im Gegensatz zu nozizeptivem Schmerz kommt es hierbei jedoch nicht nur zu einer Aktivierung von Nozizeptoren im Pankreas durch Stimulantien und einer konsekutiven Weiterleitung des Aktionspotentials über das Rückenmark zum Gehirn (Scholz & Woolf, 2007). Beim pankreatischen Schmerz handelt es sich stattdessen um einen zum Teil neuropathischen Schmerz, welcher durch die Abwesenheit von typischerweise zu Schmerzen führenden Agenzien und durch eine direkte axonale Schädigung im Zusammenspiel mit einer Vielzahl von anderen Zellen, wie etwa Schwann'sche Zellen, Immunzellen und Gliazellen des zentralen Nervensystems, charakterisiert wird (Scholz and Woolf 2007, Treede, Jensen et al. 2008).

Chronische Pankreatitiden und PCa gehen mit spezifischen, histologischen Veränderungen der Nerven einher, die in direkten Zusammenhang mit dem Auftreten von abdominalen Schmerzen gebracht wurden. Im Vordergrund stehen insbesondere die die Nerven umgebenden Entzündungszellinfiltrate, die auch als pankreatische Neuritis bezeichnet werden, und die Zunahme der Nervendichte und des Nervendurchmessers innerhalb der Bauchspeicheldrüse.

1.3.1 Pankreatische Neuritis und Schmerz im duktalem Adenokarzinom und in der chronischen Pankreatitis

Den ersten Zusammenhang zwischen Schmerzen und Nerven umgebenden Entzündungszellen stellten 1985 Keith et al. her (Keith, Keshavjee et al. 1985). In einer verblindeten Studie wurden Gewebepräparate von 50 Patienten mit CP analysiert. Hierbei konnte neben einem positiven Zusammenhang zwischen Schmerzen und Verkalkungen auch eine Korrelation zwischen der prozentualen Häufigkeit von eosinophilen Granulozyten bei der Zellinfiltration von intrapancreatischen Nerven und dem Auftreten von abdominalen Schmerzen festgestellt werden (Keith, Keshavjee et al. 1985). Im Gegensatz dazu wurde weder ein Zusammenhang zwischen Schmerzen und perineuraler Entzündung noch zwischen Schmerzen und Grad der Fibrosierung nachgewiesen (Keith, Keshavjee et al. 1985).

1988 konnten Bockman et al. diese Ergebnisse auf ultrastruktureller Ebene bestätigen (Bockman, Buchler et al. 1988). Mittels Elektronenmikroskop wurde Gewebe von Patienten mit chronischer Bauchspeicheldrüsenentzündung untersucht. Dabei wurden zwei für die spätere Forschung wichtige Beobachtungen gemacht. Zum einen sind bei Patienten mit chronischer Entzündung Anzahl und Durchmesser der Nerven innerhalb des Pankreas deutlich erhöht, wobei die von einzelnen Nerven innervierte Gewebsmenge abnimmt (Bockman, Buchler et al. 1988, Friess, Shrikhande et al. 2002, Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Zum anderen wird das Perineurium durch die Entzündung geschädigt. Die daraus resultierend frei liegenden Axone sind den Noxen und Stimuli aus dem umliegenden Gewebe frei ausgesetzt und sind in ihrer neuronalen Homöostase gestört (Bockman, Buchler et al. 1988). In späteren histologischen Untersuchungen konnte von Ceyhan et al. gezeigt werden, dass die pankreatische Neuritis nicht nur spezifisch für die CP ist, sondern auch im Gewebe von Patienten mit PCa zu finden ist. Wie auch bei Patienten mit CP korreliert hierbei das Auftreten von perineuralen Entzündungszellen mit dem Auftreten von abdominalen Schmerzen (Ceyhan, Bergmann, et al., 2009).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beim PCa und bei CP Nerven durch Entzündungszellen geschädigt werden und es gleichzeitig zu einem Umbau des Nervengeflechts kommt.

Auf solche aktive Umbaureaktionen deuten auch die Zunahme der Nervendichte und die Hochregulation des Growth-associated-Proteins 43 (GAP-43) hin, die insbesondere in hypertrophen Nerven und in Nerven mit perineuraler Neuritis stark ausgeprägt sind (Fink, Di Sebastiano et al. 1994). Eine entsprechende Hochregulation des GAP-43 korreliert ebenso wie die Infiltration von Immunzellen in Nerven mit dem Schweregrad der Schmerzen, das heißt umso stärker die neuronale Aktivität ist, desto größer ist die neuronalen Umbauprozesse. Betrachtet man in diesem Zusammenhang die pankreatische Neuritis, so zeigt sich, dass nicht nur die alleinige Existenz der pankreatischen Neuritis das Ausmaß der Schmerzen bestimmt, sondern auch dessen Schweregrad. Patienten mit der schweren endoneuralen Neuritis weisen oft ein schmerzhafteres Krankheitsbild auf als Patienten mit einer vorwiegend perineuralen Neuritis (Ceyhan, Deucker et al. 2009, Ceyhan, Demir et al. 2010).

Neben den bei der Entzündung freigesetzten Zytokinen kommt auch der Axonschädigung eine große Rolle bei der Schmerzempfindung zu. So wird bei einer Axonschädigung Neuregulin freigesetzt.

Dieses bindet sich an Schwann'sche Zellen und sorgt über einen Tyrosinkinase-Rezeptor (ERBB2) für eine Steigerung der Proliferation (Carroll, Miller et al. 1997). Dies steigert die Proliferation der Zellen und sorgt dafür, dass die Schwann'sche Zellen Botenstoffe wie Nerve-Growth-Factor (NGF) und Glial-Cell-Line-Derived-Neurotrophic-Factor (GDNF), welche das Schmerzempfinden über die Bindung an Nozirezeptoren beeinflussen können, sezernieren (Malin, Molliver et al. 2006). NGF spielt hinsichtlich der neuralen Entzündung der CP eine große Rolle; es nimmt bei vielen entzündlichen Erkrankungen von Organen eine dominante Position ein. Gewebespiegel können schnell durch Entzündungsmediatoren, beispielsweise TGF alpha und IL-1 beta, erhöht werden (Aloe, Tuveri et al. 1992, McMahon 1996). Ursprungszellen von NGF sind größtenteils Entzündungszellen wie Lymphozyten (Aloe, Tuveri et al. 1992), Makrophagen (Brown, Perry et al. 1991) und Mastzellen (Leon, Buriani et al. 1994). NGF selbst besitzt eine Zytokin ähnliche Funktion und kann dadurch die Funktion von B-Lymphozyten, Mastzellen und Makrophagen beeinflussen. Darüber hinaus kann es sich durch den TrkA-Rezeptor an sympathische und sensorische Nerven binden und nimmt so Einfluss auf die Innervation der Entzündung (McMahon 1996). So konnte bereits von Zhu et al. gezeigt werden, dass NGF durch die Regulation des pro-nozizeptiven Rezeptors TPRV1 direkt Einfluss auf die Schmerzentstehung und -wahrnehmung nimmt (Zhu, Colak et al. 2011). In einem Tierversuch mit CP konnte von Zhu et al. gezeigt werden, dass es bei Tieren mit CP und NGF-Blockade zu einer deutlicheren Herabsetzung der Schmerzreaktionen mit gleichzeitiger verminderter Expression von TPRV1-Rezeptoren kommt als bei Tieren ohne NGF-Blockade (Zhu, Colak et al. 2011).

Eine besondere Position unter den Chemokinen nehmen Fractalkine (CX3CL1) und sein Rezeptor (CX3CR1) ein. CX3CR1 wird sowohl auf zytotoxischen T-Zellen, natürlichen Killerzellen und Makrophagen (Bazan, Bacon et al. 1997, Umehara, Bloom et al. 2004) wie auch auf Spinalganglien (SG), auf Mikroglia des Rückenmarks, auf Satellitzellen und auf embryonalen Neuronen (Bazan, Bacon et al. 1997, Yoneda, Imai et al. 2000) exprimiert. Fractalkine kann die Migration und die Extravasation von zytotoxischen T-Zellen, natürlichen Killerzellen und Makrophagen in entzündliches Gewebe induzieren, indem es sich als Botenstoff an den CX3CR1-Rezeptor bindet (Deiva, Geeraerts et al. 2004, Verge, Milligan et al. 2004) und für Leukozyten zudem als Adhäsionsmolekül dienen kann (Imai, Hieshima et

al. 1997, Goda, Imai et al. 2000). In Geweben von Asthmatikern konnte darüber hinaus ein Zusammenhang zwischen der Rekrutierung von Mastzellen und von glatten Muskelzellen sezerniertem CXCL1 nachgewiesen werden (El-Shazly, Berger et al. 2006). Bei der CP haben CX3CL1 und CX3CR1 auf Grund der gezielten Rekrutierung von Lymphozyten und Makrophagen sowie wegen der Korrelation zwischen Expressionsstärke und Schmerzen an Bedeutung gewonnen. Darüber hinaus konnten Ceyhan et al. mit ihrer Studie einen möglichen pathogenetischen Ansatz für die Entstehung der pankreatischen Neuritis vorstellen. Denn hier konnten zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass eine neuronale Überexpression von Fractalkine eine gezielte Rekrutierung von Entzündungszellen begünstigt und somit die Entstehung der pankreatischen Neuritis einleitet (Ceyhan, Deucker et al. 2009). In dieser Studie konnte auch nachgewiesen werden, dass CP-Patienten mit einer endoneuralen Neuritis verglichen mit Patienten mit einer verminderten endoneuralen Infiltration an einer stärkeren Schmerzsymptomatik leiden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die pankreatische Neuritis durch die Schädigung von peripheren, intrapancreatischen Nerven und durch die gleichzeitige Zytokin und Chemokin vermittelte Sensibilisierung an der Schmerzentstehung und -wahrnehmung beteiligt ist.

1.3.2 Pankreatische Neuroplastizität und Schmerz im duktalem Adenokarzinom und in der chronischen Pankreatitis

Neben der pankreatischen Neuritis dominiert noch eine andere morphologische Besonderheit der Nerven das histologische Bild der CP und des PCa. Bereits 1988 konnte von Bockman et al. durch elektronenmikroskopische Aufnahmen festgestellt werden, dass es in Geweben von Patienten mit CP zu einer immensen Zunahme der Nervendurchmesser und der Nervenanzahl kommt – die so genannte Neuroplastizität (Bockman, Buchler et al. 1988). Andere benigne und maligne Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse, wie intraduktal papillär muzinöse Neoplasien (IPMN), seröse und muzinöse Cystadenome, neuroendokrine Tumore und Papillenkarzinome, weisen meistens eine normale Nervenstruktur auf und erreichen dabei bei Weitem nicht das Ausmaß der nervalen Veränderungen wie beim PCa oder der CP (Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Das Ausmaß dieser neuronalen Hypertrophie korreliert nicht nur mit dem Auftreten von abdominalen Schmerzen in der CP und im PCa, sondern auch mit der Invasion von

Tumorzellen in intrapancreatische Nerven (Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Auffällig in diesem Zusammenhang ist die Hochregulation von Artemin, NGF und GAP-43. GAP-43 kommt in besonders hohen Konzentrationen in Geweben von Patienten mit CP und PCa vor (Ceyhan, Bergmann et al. 2009, Demir, Ceyhan et al. 2010). Die Expression von GAP-43 spiegelt sich dabei im Beschwerdebild von Patienten wider. So leiden Patienten mit hohen Gewebespiegeln häufiger an abdominalen Schmerzen als Patienten mit niedrigerer Expression (Di Sebastiano, Fink et al. 1997). Auffallend ist, dass sich die Zunahme des Nervengeflechts nicht nur auf das pathologisch veränderte Gewebe beschränkt. Durch Untersuchungen des an krankhaft verändertes Gewebe grenzenden, gesunden Gewebes konnte gezeigt werden, dass es dort ebenfalls zu einer Hochregulation von Artemin und NGF mit gleichzeitiger Zunahme der Nervendichte kommt (Ceyhan, Schafer et al. 2010).

Eine Zunahme der intrapancreatischen Nerven findet in besonderem Maße nur in Geweben mit CP und PCa statt. Gleichzeitig korrelieren das Auftreten und die Zunahme des Nervengeflechts mit dem Auftreten von abdominalen Schmerzen. Die Zunahme der Nervendichte beschränkt sich zudem nicht auf das pathologisch veränderte Gewebe, sondern kann auch im gesunden Gewebe, welches direkt an das krankhaft veränderte grenzt, festgestellt werden.

1.3.3 Neurale Invasion und Schmerzen

Eine wichtige Position in der Symptomatik und in der langzeitigen Prognose des PCa der Bauchspeicheldrüse nehmen die charakteristischen abdominalen Schmerzen ein. So korreliert das Auftreten von abdominalen Schmerzen beim PCa mit der Größe des Primärtumors, mit der Invasion von Tumorzellen in intrapancreatische Nerven sowie mit der Tumordinfiltration in die vordere Bauchspeicheldrüsenkapsel und dem Ausbilden von Lymphknotenmetastasen (Okusaka, Okada et al. 2001). Ähnliches gilt auch für die Schmerzintensität. Patienten, bei welchen der Tumor bereits in die vordere Kapsel eingewachsen ist, die bereits Lymphknotenmetastasen ausgebildet haben oder sich in fortgeschrittenen Tumorstadien befinden, leiden an stärkeren Schmerzen als Patienten ohne diese Merkmale (Okusaka, Okada et al. 2001). Darüber hinaus konnten mehrere Studien zeigen, dass Schmerzen nicht nur einen Hinweis auf die Re-

sektabilität geben, sondern dass PCa-Patienten mit milden Schmerzen eine längere Überlebenszeit haben als Patienten mit ausgeprägten abdominalen Schmerzen (Okusaka, Okada et al. 2001, Ceyhan, Bergmann et al. 2009, Demir, Friess et al. 2012).

Eine Interaktion von Tumorzellen und Nerven wurde erstmals 1994 durch den Anatomen Dale Bockman beschrieben. In elektronenmikroskopisch durchgeführten Untersuchungen der Gewebeproben von Patienten mit Bauchspeicheldrüsenkrebs konnte er zeigen, dass Tumorzellen die Integrität von Nerven verletzen, diese direkt invadieren und sie schädigen (Bockman, Buchler et al. 1994). Hinsichtlich der Schmerzintensität spielt nicht nur die Häufigkeit der Nerveninvasion von Tumorzellen eine entscheidende Rolle, sondern ob die Invasion perineural oder gar endoneural erfolgt. Dieser unterschiedliche Schweregrad der neuralen Invasion spiegelt sich auch in der Schmerzintensität der Patienten wider. So empfinden Patienten, bei denen Krebszellen nur bis zum Epi- oder Perineurium invadieren, oft geringere Schmerzen als Patienten mit einer schweren endoneuralen Tumordinfiltration (Ceyhan, Bergmann et al. 2009).

Zwei neurotrophische Faktoren, die bei der Nerv-Tumor-Interaktion im PCa der Bauchspeicheldrüse eine Schlüsselrolle spielen zu scheinen, sind Artemin und der NGF sowie dessen Rezeptoren GFR α 3 bzw. TrkA. Zhu et al. konnten zeigen, dass die mRNA-Konzentrationen von NGF-Zugabe in Tumoren von Patienten mit stärkeren Schmerzen erhöht sind. NGF wird von Tumorzellen gebildet, wohingegen der Rezeptor hauptsächlich vom Perineurium exprimiert wird. Eine Steigerung der mRNA-Level von NGF und TrkA findet vor allem in Nerven mit perineuraler Invasion statt (Zhu, Friess et al. 1999). Aber nicht nur auf die Invasion von Nervenzellen haben NGF und TrkA Einfluss; unter NGF und TrkA kommt es auch zu einer Proliferationssteigerung von Tumorzellen (Zhu, Kleeff et al. 2002).

Genau wie NGF wird auch Artemin in PCa überexprimiert. Dadurch kommt es zu einer deutlichen Zunahme der Nervendichte im Tumor und im umliegenden Gewebe (Ceyhan, Schafer et al. 2010). Außerdem können erhöhte Konzentrationen von Artemin auch die Invasionsfähigkeit von Tumorzellen bis auf das Fünffache erhöhen (Ceyhan, Giese et al. 2006).

Einen ebenfalls nicht zu unterschätzenden Stellenwert nimmt die neurale Invasion sowohl hinsichtlich der Lokalrezidivrate als auch hinsichtlich der Disease-free-Survival-Zeit und des Gesamtüberlebens ein. So ist das Gesamtüberleben wie auch die Zeit bis zum Wiederauftreten des Tumors bei Patienten mit neuraler Tumordinvasion verglichen mit Patienten ohne Tumordinfiltration signifikant verkürzt (Chatterjee, Katz et al. 2012). Dabei wirken sich nicht nur das Vorhandensein, sondern auch die Intensität der Nerveninfiltration bezüglich der Verkürzung der Überlebens- und Rezidivzeit aus. Patienten, bei denen Tumorzellen in die Nerven hineinmigrieren und -wachsen, zeigen eine schlechtere Prognose als Patienten, bei denen Tumorzellen nur die Nervenscheide infiltrieren (Chatterjee, Katz et al. 2012). Auffällig ist die Zunahme der abdominalen Schmerzcharakteristik bei Zunahme der Durchbrechung der Nervenintegrität durch Tumorzellen (Ceyhan, Bergmann et al. 2009).

Die durch den Patienten empfundenen Schmerzen spiegeln nicht allein die Zunahme der Tumorzellaggressivität wider. Es steigen auch mit Zunahme der Infiltrations- und Invasionsfähigkeit der Tumorzellen der Stärkegrad der desmoplastischen Reaktion (die fibrotische Umbaureaktion des Pankreasgewebes auf Tumorzellen) im Pankreasgewebe und das Ausmaß der neuralen Invasion (Ceyhan, Bergmann et al. 2009).

2. Ziel der Studie

Das Phänomen der pankreatischen Neuritis wurde bereits 1988 von Keith et al. in der CP bzw. 2009 von Ceyhan et al. im PCa beschrieben und mit dem Auftreten von pankreatischer Neuroplastizität und abdominalen Schmerzen in Verbindung gebracht (Keith, Keshavjee et al. 1985, Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Bislang brachte eine Untersuchung von Geweben von Patienten mit gesunder Bauchspeicheldrüse, mit CP und mit PCa die Erkenntnis, dass es sich bei den Entzündungszellinfiltraten in CP und PCa um vorwiegend CD8+ Lymphozyten handelt (Emmrich, Weber et al. 1998). Eine genaue Identifizierung der an der neuralen Entzündung beteiligten Immunzelltypen bei CP und PCa sowie die Analyse der Verteilung bei Patienten mit und ohne Schmerzen wurden jedoch noch nicht vorgenommen. Eine Identifizierung der an der pankreatischen Neuritis beteiligten Entzündungszellen in Abhängigkeit zum Vorhandensein von Schmerzen würde eine mögliche therapeutische Option bieten, relevante Entzündungszellen gezielt durch Pharmaka zu behandeln und dadurch die Schmerzsymptomatik zu mildern.

Daher war es das Hauptziel der vorliegenden Doktorarbeit,

1. die perineuralen Entzündungszellen in der CP und im PCa zu identifizieren,
2. die Verteilung der einzelnen Immunzellklassen in Abhängigkeit zum Auftreten von abdominalen Schmerzen zu analysieren,
3. eine Phänotyp-Analyse der für die Schmerzentstehung relevanten Zellen sowie deren Verteilung in Patienten mit und ohne Schmerzen vorzunehmen und
4. mögliche an der Schmerzentstehung- und wahrnehmung beteiligte Rezeptoren zu untersuchen.

In einem ersten Versuch wurden für die Charakterisierung von perineuralen Entzündungszellen Gewebepräparate von 20 Patienten mit CP und 20 Patienten mit PCa immunhistologisch gegen

PGP9.5 als Marker für Nerven,

CD45 als pan-leukozytärem Marker,

CD8 als Marker für zytotoxische T-Lymphozyten,

CD68 als Marker für Makrophagen,

Tryptase als Marker für Mastzellen,

CD4 für T-Helferzellen,

CD20 für B-Zellen,

PRG-2 für eosinophile Granulozyten und

NCL-PC als Plasmazellmarker

gefärbt. Nach Identifikation der Entzündungszellen wurden die Patienten anhand der Existenz von abdominalen Schmerzen in zwei Gruppen (mit Schmerzsymptomatik/ohne Schmerzen) unterteilt und die Verteilung der oben aufgeführten Immunzellgruppen untersucht.

Da die Mastzellen hierbei eine herausragende Rolle einnahmen, wurde deren Phänotyp in einer zweiten Versuchsreihe in 16 normalen Pankreasgeweben und je 20 Gewebepreparate von Patienten mit CP und PCa bestimmt. Anschließend erfolgte die Unterteilung der Patienten in zwei Gruppen analog wie bei der Charakterisierung der Entzündungszellen.

Darüber hinaus wurde anhand der Rezeptoren der Protease-Aktivierten-Rezeptoren Typ 1 und Typ 2 (PAR-1 und PAR-2) die Expression von für die Schmerzentstehung und -wahrnehmung relevanten Rezeptoren überprüft. Hierzu wurde die Expression auf mRNA durch quantitative Real-Time-PCR und auf Proteinebene durch immunhistochemische Färbungen in gesundem Gewebe (n=16), Gewebe von Patienten mit CP (=20) und PCa (=20) analysiert und miteinander verglichen. Nach der Kontrolle der Expression in gesunden und pathologischen Präparaten wurden die Gewebe von Patienten mit CP und PCa erneut anhand der Schmerzsymptomatik in zwei Gruppen unterteilt und die Expression anhand des Schmerzbildes verglichen.

3. Material und Methoden

3.1 Reagenzien

Folgende chemische Reagenzien in alphabetischer Ordnung wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Alexa Fluor® 488 Antikörper (Invitrogen, Deutschland)

Alexa Fluor® 594 Antikörper (Invitrogen, Deutschland)

Aqua destillata, Braun (Melsung, Deutschland)

Anti-Kaninchen-HRP-Antikörper, Dako Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)

Anti-Maus-HRP-Antikörper, Dako Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)

BSA, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Chloroform, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

CSA-Kit, Dako Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)

cDNA-Synthesis-Kit, Roche (Mannheim, Deutschland)

Ethanol, Merck (Darmstadt, Deutschland)

HCl, Klinikum rechts der Isar (München, Deutschland)

Hydrogenperoxide 30%, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Isopropanol, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Methanol, Merck (Darmstadt, Deutschland)

Natriumchlorid (NaCl), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Roticlear, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

LightCycler-480 SYBR Green I Master Kit, Roche (Mannheim, Deutschland)

Tris, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Trizol Reagent, Ambion, Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)

Tween-20, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

3.2 Antikörper

Antikörper	Spezies	Typ	Verdünnung	Firma
Anti-PGP 9.5	Maus	Monoklonaler Antikörper	1:1000	Dako, Hamburg, Deutschland
Anti-CD45	Kaninchen	Polyklonaler Antikörper	1:500	Antibodies Online, Aachen, Deutschland
Anti-CD8	Kaninchen	Polyklonaler Antikörper	1:60	Diagnostic BioSys- tems, CA, USA
Anti-CD4	Kaninchen	Polyklonaler Antikörper	1:60	Monosan, Uden, Niederlande
Anti-CD68	Maus	Monoklonaler Antikörper	1:60	Diagnostic BiosSys- tems, CA, USA
Anti-CD20	Maus	Monoklonaler Antikörper	1:500	Novocastra/Leica, Wetzlar, Deutschland
Anti-PRG2	Kaninchen	Polyklonaler Antikörper	1:500	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Anti-NCL-PC	Maus	Monoklonaler Antikörper	1:16000	Novocastra/Leica, Wetzlar, Deutschland
Anti-Mastzellen- Tryptase	Kaninchen	Monoklonaler Antikörper	1:800	Abcam, Cambridge, UK

Antikörper	Spezies	Typ	Verdünnung	Firma
Anti-Mastzellen-Chymase	Ziege	Polyklonaler Antikörper	1:200	Acris Antibodies, Herford, Deutschland
Anti-Par-1	Maus	Monoklonaler Antikörper	1:100	Santa Cruz Biotech, Deutschland
Anti-Par-2	Kaninchen	Polyklonaler Antikörper	1:4000	LifeSpan/Biozol, Eching, Deutschland

3.3 Geräte

- Keyence Biorevo BZ-9000 System (Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland)
- Real-Time LightCycler® 480, Roche (Basel, Schweiz)
- Mikrowelle: Sharp (Ōsaka, Japan)
- Nanodrop: Nanodrop 2000, Thermo Scientific (Dreieich, Deutschland)
- PCR Maschine: Mastercycler, Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
- Sartorius Dismembrator S (Göttingen, Deutschland)
- Vortexer: IKA Works, INC., MS 1 Minishaker (Wilmington, Vereinigte Staaten von Amerika)
- Zentrifuge: Centrifuge 5810 R, Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)

3.4 Patienten und Gewebe

Das Pankreasgewebe für die immunhistochemischen Untersuchungen wurde von Patienten, bei denen auf Grund eines PCa des Pankreaskopfs (n = 20; 8 männliche Patienten, 12 weibliche Patientinnen, medianes Alter: 66 Jahre) oder einer CP (n = 20; 13 männliche Patienten, 7 weibliche Patientinnen, medianes Alter: 51 Jahre) der Pankreaskopf entfernt werden musste, entnommen. Gemäß der internationalen Tumorklassifikation der UICC (2009) hatten alle diese Patienten ein Karzinom vom Stadium IIb. Die chronische Bauspeicheldrüsenentzündung war in allen Fällen alkoholischer Genese. Gesundes Pan-

kreasgewebe stammte aus Spenderorganen, bei welchen aus diversen Gründen keine Organspende erfolgen konnte. Alle Patienten wurden über die Entnahme von Gewebe zu Forschungszwecken aufgeklärt und willigten hierzu ein. Die Durchführung der Gewebesammlung wurde von der Ethikkommission der Technischen Universität München und der Universität Heidelberg überprüft und genehmigt.

Entnommenes Pankreasgewebe wurde sofort nach Entnahme in 4%igem Paraformaldehyd fixiert und in einem automatisierten System in Paraffin eingebettet.

3.5 Abdominale Schmerzen

Bei allen oben genannten Patienten mit CP oder PCa wurde prospektiv vor Durchführung der Operation ein individueller Schmerzscore aus der Schwere und Häufigkeit der Schmerzen ermittelt. Die Schmerzstärke wurde in drei Stufen unterteilt: Patienten ohne Schmerzen wurde der Wert 0, Patienten mit leichten Schmerzen der Wert 1, denjenigen mit moderaten Schmerzen der Wert 2 und denen mit starken Schmerzen der Wert 3 zugewiesen. Entsprechend der Frequenz wurden die Patienten in 3 Gruppen unterteilt. Der Wert 1 steht für monatliche, der Wert 2 für wöchentliche und der Wert 3 für tägliche Schmerzen. Die Werte aus Schmerzintensität und Frequenz wurden dann zur Erfassung des individuellen Schmerzscore miteinander multipliziert. Mittels dieser Endwerte wurden die Patienten letztlich in drei Gruppen unterteilt: Pain I (0) steht dabei für keine, Pain II (1-3) für milde und Pain III (4-9) für einen moderaten bis starken Schmerzcharakter.

3.6 Immunhistologie und Doppel-Immunfluoreszenz-Färbung

Konsequente, in Paraffin eingebettete, 3µm dicke Gewebeschnitte von Patienten mit CP, PCa und gesundem Pankreas wurden mit dem nervenspezifischen Protein PGP 9,5 und immunzellenspezifischen Markern gefärbt. Der Oberflächenmarker Cluster of Differentiation 45 (CD45) wurde für die Erfassung aller Immunzellen genutzt. CD8 diente der Erfassung der zytotoxischen T-Lymphozyten, CD4 der Erfassung der T-Helfer-Zellen, CD20 der der B-Lymphozyten; CD68 wurde für Makrophagen, NCL-PC für Plas-

mazellen, PRG 2 für eosinophile Granulozyten, Tryptase und Chymase für die Identifizierung von Mastzellen benutzt. Zusätzlich wurden konsekutive Schnitte für die immunologische Färbung der Protease-Aktivierten-Rezeptoren Typ 1 (PAR-1) und Typ 2 (PAR-2) angefertigt.

Für die immunhistologische Färbung wurden die Gewebeschnitte zuerst in Roticlear entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydratisiert. Nach der Rehydratisierung wurden die Gewebepräparate 10 Minuten in Citratpuffer gekocht und danach 15 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte zuerst 5 Minuten in Triton-X100 und danach ebenfalls 5 Minuten in 3%-igem Wasserstoffperoxid inkubiert. Danach erfolgte die Blockade von unspezifischen Bindungsstellen mit Ziegenserum. Da der Antikörper für die Mastzellchymase ebenfalls in Ziegen hergestellt wurde, wurde für die Doppelfärbung der Mastzelltryptase/Chymase eine 5%-ige BSA-Lösung verwendet. Entsprechend den oben angegebenen Konzentrationen (Tabelle 1) wurden die Schnitte nach der Blockade der unspezifischen Bindungsstellen über Nacht in einer sogenannten Wet-Box bei 4°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurden unspezifische Antikörper derselben Immunklasse derselben Spezies verwendet. Eine Verdünnung der primären Antikörper wurde mit Ausnahme der Mastzelltryptase/Chymase-Antikörper, die mit 5%-iger BSA-Lösung erfolgte, in normalem Ziegenserum durchgeführt. Eine Detektion der Antikörper wurde mit dem DAKO Envision System-HRP (Hamburg, Deutschland) oder im Fall der Chymase-Tryptase Immunfluoreszenz Doppelfärbung der Mastzellen mit Alexa Fluor® 488 (Chymase) und 594 (Tryptase) Antikörper (Invitrogen, Deutschland) vorgenommen. Die PAR-2 Rezeptor-Immunfärbung erfolgte mit dem Catalyzed-Signal-Amplification (CSA) Kit der Firma DAKO.

Als chromogenes Reagenz wurden DAB und bei der Immunfluoreszenz DAPI verwendet. Die digitale Untersuchung und Aufnahme der Gewebeschnitte erfolgte mit dem Keyence Bioevo BZ-9000 System (Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland).

3.7 Quantitative Analyse der Immunzellenverteilung

Die pankreatische Neuritis wird definiert als eine Anhäufung von Immunzellen um einen Nerv, welche keine erkennbare direkte Verbindung zum Immunzellinfiltrat im Restgewebe aufweist. Die Immunzellen stehen dabei in direktem Kontakt zum Perineurium oder Endoneurium der Nerven und sind klar von den übrigen Immunzellen, welche das übrige erkrankte Gewebe infiltrieren, abgrenzbar. Die Quantifizierung dieser Immunzellen erfolgte mit der ImageJ Software (ImageJ 1.36b, Wayne Rasband). Hierzu wurden in der PGP 9.5.-Immunfärbung pro Patient zwischen 3 und 5 Nerven mit Neuritis gesucht und abfotografiert. Um die Menge der Immunzellen zu quantifizieren, wurde das Bild zuerst von einem RGB-Bild zu einem 8-Bit-Bild umformatiert. Anschließend wurden mit der Threshold-Funktion der Software und einem zuvor eingestellten Threshold, welcher ausschließlich die durch die Immunreaktion gefärbten Zellen erfasste, automatisch die absolute und die relative (Prozent) Fläche an Immunreaktion erfasst. Um das Ausmaß der einzelnen Immunsotypen zu bestimmen, wurde zuerst die absolute Fläche, welche durch die Immunreaktion für CD4, CD8, CD20, CD68, NCL-PC, PRG2, Tryptase und Chymase gemessen wurde, bestimmt und danach mit der Fläche des Pan-Leukozyten-Markers CD45 relativiert. Der sich daraus ergebende Prozentwert spiegelt die Verteilung der Immunzellenklassen der an der Neuritis beteiligten Immunzellen wider. Sowohl die einzelnen Bildaufnahmen wie auch die darauf folgende quantitative Auswertung erfolgten verblindet zu den klinischen und immunhistologischen Daten.

3.8 Real-Time LightCycler® Quantitative-Polymerase-Chain-Reaction (QRT-PCR)

RNA aus PCa und aus Gewebe von Patienten mit CP wurde mit Hilfe von Trizol extrahiert. Dabei wurde das Standardprotokoll des Herstellers genau eingehalten. Auf 1 ml Trizol kam ein 50-100 mg schweres Gewebestück. Dieses wurde mithilfe eines Homogenisators (Sartorius Dismembrator S) zerkleinert. Die Gewebeproben können entweder bei -80 °C eingefroren oder sofort verarbeitet werden. Zu Beginn der RNA-Extraktion mit Trizol wurde die homogenisierte Probe für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zugefügt, ca. 15 s geschüttelt und für 2-3 min

bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Lysat zur Phasenseparation 15 min. bei 4 °C mit 12.000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase, in der sich die RNA befand, wurde in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß abpipettiert, die organische Phase, in der DNA und Proteine enthalten waren, wurde verworfen. Zur Fällung der RNA wurde die wässrige Phase mit 500 µl 100%igem Isopropanol versetzt und danach 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um die ausgefallene RNA sichtbar zu machen, wurde das Reaktionsgefäß im Anschluss für 10 min bei 12.000 rpm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das RNA-Pellet wurde nun mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen und daraufhin wieder für 5 min bei 7.500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut dekantiert und das Pellet für ca. 5- 10 min an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die RNA in 30 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Zuletzt wurde das Reaktionsgefäß mit der extrahierten RNA für 10 min auf 55-60 °C aufgeheizt. Nach dieser Extraktion wurden die Konzentration und die Reinheit der entstandenen RNA am Nanodrop gemessen. Aus Patientengewebe gewonnene mRNA wurde vor dem Umschreiben in die cDNA mit DNase-Verdau vorbehandelt, um die restliche DNase größtenteils zu eliminieren. Nachdem der DNase-Verdau gestoppt worden war, erfolgte nach der Anweisung des Herstellers die Umschreibung der isolierten RNA in cDNA mit cDNA-Synthesis-Kit (Roche, Mannheim, Deutschland).

Um eine unterschiedliche Expression von PAR-1 und PAR-2 Rezeptoren bei Patienten mit CP, PCa und bei gesunden Patienten zu analysieren, wurde zuerst pro Versuch ein Mittelwert aus Duplikaten von 6 Patienten pro Gruppe ermittelt. Insgesamt wurde der Versuch 3-mal mit unterschiedlichen Patientenproben durchgeführt, so dass am Ende 18 Proben pro Gruppe zur Auswertung der Expression von PAR-1 und PAR-2 Rezeptoren verfügbar waren. Für die Fragestellung, inwiefern PAR-1 und PAR-2 Rezeptoren bei der Entstehung und Empfindung von Schmerzen beteiligt sind, wurden mRNA-Patientenproben in drei unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Gruppe 1 bestand aus Patienten mit CP bzw. PCa ohne Schmerzen, Gruppe 2 aus Patienten mit leichten Schmerzen und Gruppe drei beinhaltete Patienten mit moderaten und starken Schmerzen. Entsprechend der Analyse der Gewebe wurde auch hier ein Mittelwert aus einem Duplikat pro Patient gebildet.

Von allen Patientenproben wurden die Expression des Protease-Aktivierten-Rezeptors Typ 1 (PAR-1, GeneBank, GeneID:2149), des Protease-Aktivierten-Rezeptors Typ 2 (PAR-2, GeneBank, GeneID:2150) sowie die Expression des Referenz-Housekeeping-Gens Cyclophilin-B (CypB, GeneBank,

GeneID:5479) mittels des Roche LightCycler-480-Real-Time PCR Systems und LightCycler-480 SYBR Green I Master Kit gemessen. Die Auswertung der Expression erfolgte anschließend nach der Pfaffl-Methode. Demnach korreliert nach Effizienzkorrektur der unterschiedlichen Primer die relative Expression von PAR-1 und PAR-2 mit der durchschnittlichen Abweichung der Crossing Points der Proben, welche zuvor auf das Referenz-Housekeeping-Gen normalisiert wurden.

3.9 Bestimmung und Auswertung der neuralen Immunreaktivität von PAR-1 und PAR-2

Die immunologische Reaktivität der PAR-1 und PAR-2 Expression wurde auf jedem Gewebeslide mit der ImageJ-basierten Colorimetrie bestimmt. Hierzu wurden alle Bilder vom RBG-Format auf ein 8-Bit-Format umformatiert. Im Anschluss daran wurde die prozentual gefärbte Fläche in jedem Nerv ermittelt, indem für jede Immunfärbung ein von der Immunreaktivität von PAR-1 bzw. PAR-2 abhängiger Threshold bestimmt und die Auswertung auf die Nerven eingeschränkt wurde. Um die Expression von PAR-1 und PAR-2 bei gesunden Patienten, Patienten mit CP und Patienten mit PCa vergleichen zu können, wurde ein Mittelwert der Immunreaktivität aller Nerven mit Neuritis eines Patienten gebildet, um die durchschnittliche Immunreaktivität jedes einzelnen Patienten zu erhalten.

Um die Expression von PAR-1 und PAR-2 in den unterschiedlichen Geweben vergleichen zu können, wurden Patienten mit gesunder Bauchspeicheldrüse mit Patienten mit CP oder mit PCa verglichen.

Für die Analyse der Rezeptorenexpression in Abhängigkeit des Vorhandenseins oder der Abwesenheit von abdominalen Schmerzen wurden Patienten mit CP bzw. mit PCa in Gruppen mit und ohne Schmerzsymptomatik unterteilt.

3.10 Statistische Auswertung und Analyse

Statistische Analysen und Auswertungen wurden mit der Software Graphpad Prism 5 (La Jolla, CA, USA) vorgenommen. Auf Grund von multiplen Vergleichen und wegen der wechselseitigen Abhängig-

keit der gemessenen Zelluntergruppenareale und der Prozentangaben innerhalb einer gegebenen Neuritis-Population wurde erst der Friedman's-Test gefolgt vom Dunn's-post-hoc-Test zur Errechnung einer statistischen Wahrscheinlichkeit aufgeführt. Hierbei wurde der Test insbesondere für die Analyse und den Vergleich der Immunreaktivität der verschiedenen Immunzellpopulationen und ebenso für den Vergleich und die Analyse der relativen, also prozentualen Verteilungen innerhalb der einzelnen Neuritiden herangezogen. Für den Vergleich der unterschiedlichen Expressionen von PAR-1 und PAR-2 innerhalb der Proben von Patienten mit entweder gesundem Gewebe, CP oder PCa wurde der Kruskal-Wallis-Test in Verbindung mit dem Dunn's-post-hoc-Test verwendet.

Für einen adäquaten Vergleich der Immunreaktivität der einzelnen Immunzellsubklassen und für die Immunreaktivität von PAR-1 und PAR-2 innerhalb der entzündeten Nerven von Patienten mit und ohne Schmerzen, wurde der Mann-Whitney-U-Test ausgewählt. Zusätzlich wurde zur Überprüfung und Bestätigung des Ergebnisses zwischen den beiden Gruppen der t-Test für ungepaarte Stichproben durchgeführt.

Für eine Analyse und Überprüfung der unterschiedlichen Mastzellpopulationen bezüglich der Frequenz der Tryptase- und Chymase-Doppellokalisierung wurde der Fisher's-exact-Test verwendet.

Die Ergebnisse werden mit Ausnahme der mRNA-Expression, die als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt werden, als Median (Minimum, Maximum) angegeben. Zweiseitige p-Werte wurden bestimmt und ein statistisch signifikanter Unterschied ab einem p-Wert ≤ 0.05 angenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Zytotoxische T-Zellen, Makrophagen und Mastzellen sind die vorherrschenden Entzündungszellen der pankreatischen Neuritis im duktalem Adenokarzinom des Pankreas und der chronischen Pankreatitis.

4.1.1. Pankreaskarzinom

Der Schwerpunkt der Dissertation liegt auf der Identifizierung und Quantifizierung der mengenmäßigen Verteilung von Leukozyten und Leukozytensubgruppen bei pankreatischer Neuritis. Die Existenz von perineuralen Entzündungsherden und der Zusammenhang dieser mit Schmerzen sind dabei schon seit den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts bekannt (Keith, Keshavjee et al. 1985), eine Charakterisierung der einzelnen Immunzelltypen, ist allerdings bis heute noch nicht erfolgt und stellt das Kernstück der vorliegenden Dissertationsarbeit dar. Hierzu wurden die Gewebeschnitte von Patienten immunhistochemisch gegen PGP 9.5, CD45, CD8, CD68, Tryptase, CD4, CD20, NCL-PC und PRG2 gefärbt (Abb.1), die Flächen, welche die einzelnen Immunzellsubpopulationen immunoreaktiv einnehmen, kolormetrisch erfasst und zur Zellfläche der gesamten Leukozytenpopulation in Relation gesetzt (Abb. 2).

Die Mehrheit an Immunzellen, die an der pankreatischen Neuritis im PCa beteiligt sind, wird von CD68+ Makrophagen [medianer prozentualer Anteil: 39.87% (Min. 10.15; Max. 64.88), mediane Fläche 2545 μm^2 (Min. 665.9; Max. 22012)] gebildet. Darüber hinaus sind maßgeblich CD8+, zytotoxische T-Lymphozyten mit 33.20% [33.20% (21.06; 54.11), 2623 μm^2 (586.5; 21092)] an den Entzündungsfoci beteiligt. An dritter Stelle folgen Mastzellen mit einem Anteil von 14,46% an den CD45+ Immunzellen [14.46% (0.28; 52.10), 1106 μm^2 (21.51; 16090)].

Auffallend bei der Untersuchung der pankreatischen Neuritis im PCa war, dass alle anderen untersuchten Hauptimmunzellpopulationen, wie CD20+ B-Lymphozyten [0,79%, (0.10; 13.84), 76.84 μm^2 (3.06; 2598)], CD4+ T-Helferzellen [1.61% (0.39; 28.45), 83.03 μm^2 (13.55; 2962)], NCL-PC+ Plasmazellen [1.87% (0.01; 10.54), 140.9 μm^2 (0.31; 986.9)] und PRG2+ eosinophile Granulozyten

[0.49% (0.10; 19.77), 38.71 μm^2 (9.93; 888.8)], nur in äußerst geringen Mengen vorgefunden wurden und bei der pankreatischen Neuritis im PCa nur eine untergeordnete Rolle spielten.

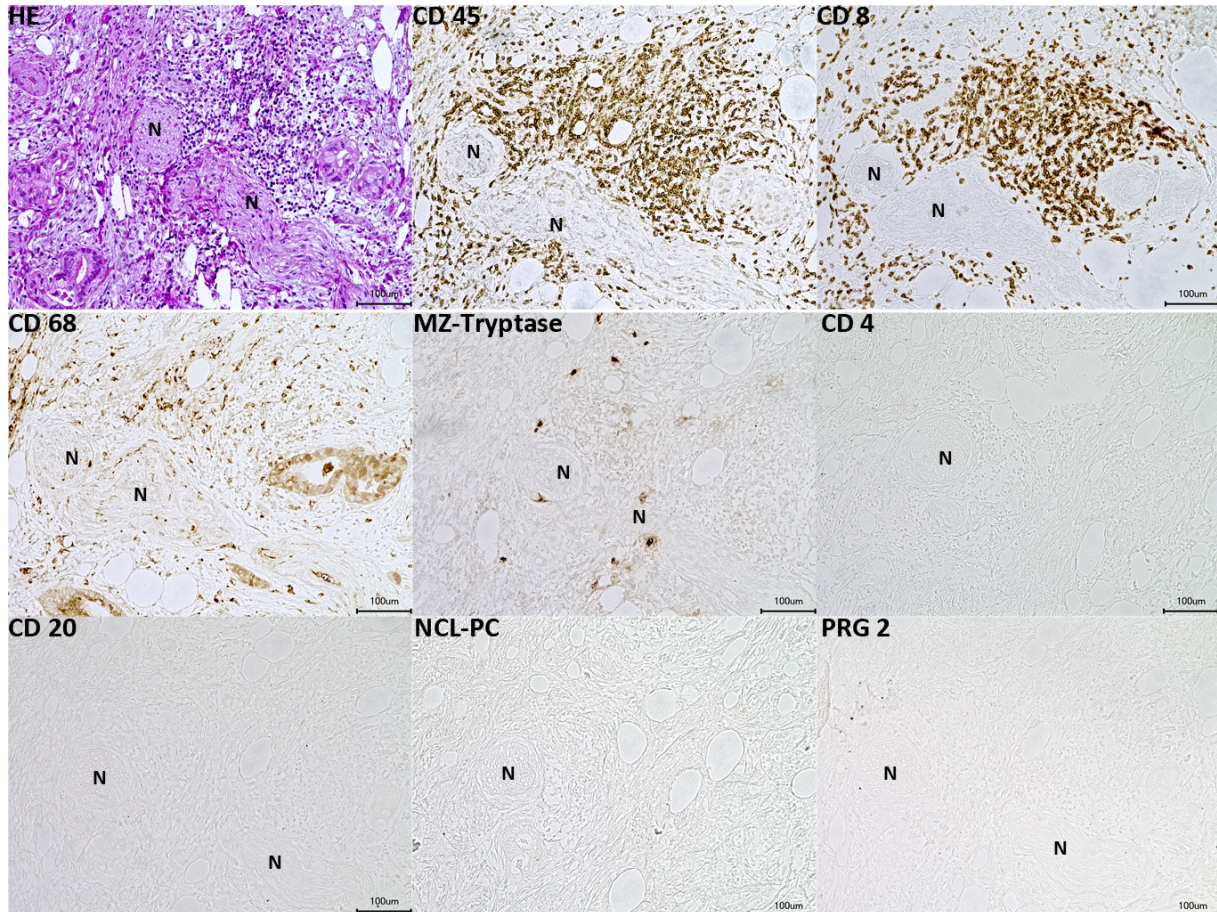


Abb. 1 zeigt die immunhistologische Anfärbung der Immunzellen, die an der pankreatischen Neuritis im PCa teilnehmen. Pankreatische Neuritis wurde hierfür entweder in einem Hämatoxylin-Eosin oder in einem PGP-9.5 Gewebepräparat identifiziert. An der Neuritis beteiligte Immunzellen wurden in konsekutiven Gewebepräparaten immunhistologisch mit dem Pan-Leukozytären-Marker CD45, CD8, CD68, Mastzellen-Tryptase, CD4, CD20, NCL-PC oder mit PRG2 angefärbt und identifiziert. Pro Patient wurden zwischen 3 und 5 Nerven analysiert. Auffällig ist die Tatsache, dass die Neuritiden im PCa vorwiegen von CD-8+ zytotoxischen T-Lymphozyten, CD-68+ Makrophagen und Tryptase+ Mastzellen gebildet werden.

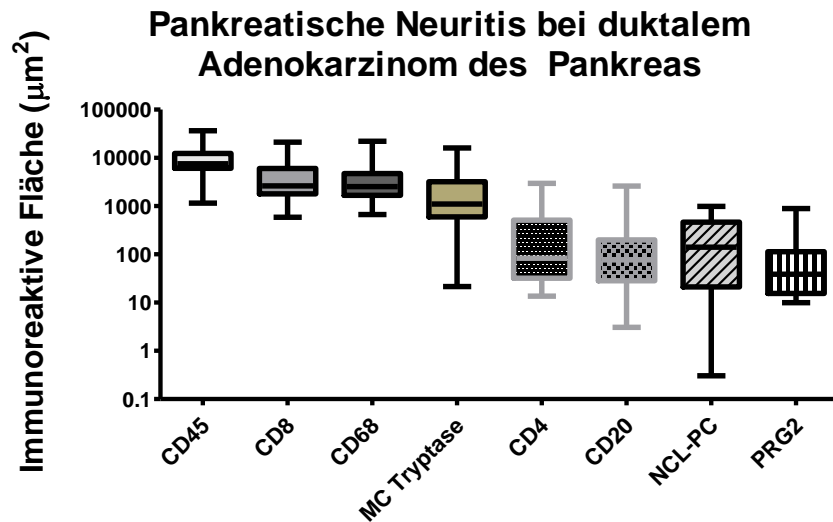


Abb. 2 stellt die Fläche dar, die die unterschiedlichen Immunreaktionen an der pankreatischen Neuritis im PCa einnehmen. Hierbei tritt die Dominanz von CD8+ positiven, zytotoxischen Lymphozyten, CD68+ Makrophagen und Tryptase+ Mastzellen an den Immunzellen, die die Neuritis bilden, hervor. Andere Immunzellen sind hingegen nur in äußerst geringem Maß bei der pankreatischen Neuritis beteiligt.

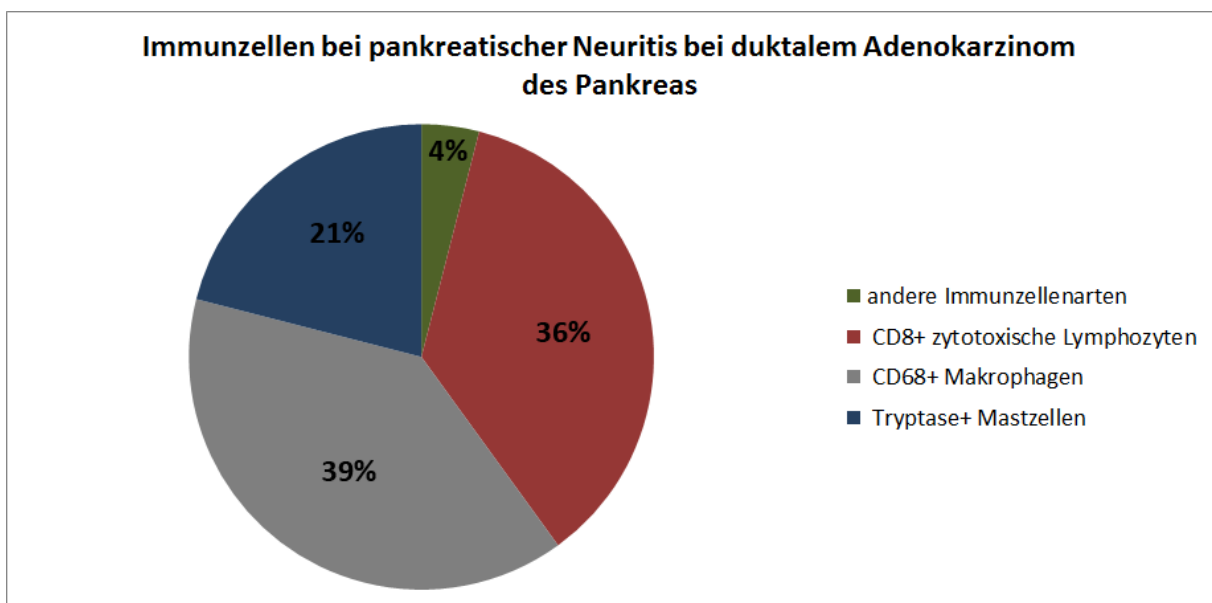


Abb. 3 verdeutlicht die prozentuale Verteilung von CD8+ zytotoxischen Lymphozyten, CD68+ Makrophagen und Tryptase+ Mastzellen an der pankreatischen Neuritis im PCa. Hierbei bilden CD8+ Lymphozyten, CD68+ Makrophagen und Tryptase+ Mastzellen über 95% der Immunzellpopulation.

4.1.2 Chronische Pankreatitis

Analog zu den Geweben aus Patienten mit PCa wurden Gewebepreparate von Patienten mit CP immunhistochemisch gegen PGP 9.5, CD45, CD8, CD68, Tryptase, CD4, CD20, NCL-PC und PRG2 gefärbt (Abb. 4) und danach die Fläche und die prozentuale Verteilung, die die einzelnen Subklassen an der perineuralen Neuritis einnehmen, ermittelt (Abb. 4-6).

Eine Quantifizierung der Entzündungszellen bei der pankreatischen Neuritis von Patienten mit CP ergab, dass es sich um eine ähnliche Verteilung der Entzündungszellen wie beim PCa handelt (Abb. 2, Abb. 3, Abb. 5, Abb. 6). Ebenso wie beim PCa bilden vorwiegend CD68+ Makrophagen [34.40% (1.562; 54.22), 1852 μm^2 (126.9; 11667)] den dominanten Anteil bei den Entzündungszellen. CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten [34.17% (12.27; 78.97), 2064 μm^2 (142.7; 11334)] bilden analog zum PCa die zweithäufigste Population an neuralen Immunzellen, gefolgt von Mastzellen [24.16% (1.78; 56.63), 2339 μm^2 (221.1; 10155)] (Abb. 5 und Abb.6). Alle anderen untersuchten Subpopulationen wie CD20+ B-Lymphozyten [0,57% (0.07; 3.19), 21.93 μm^2 (1.27; 293.9)], CD4+ T-Helferzellen [0.56% (0.16; 6.22), 27.77 μm^2 (5.38; 1325)], PRG2+ eosinophile Granulozyten [0.61% (0.13; 6.24), 23.33 μm^2 (2.41; 1384)] und NCL-PC+ Plasmazellen [1.20% (0.05; 17.44), 121.3 μm^2 (2.08; 474.3)] konnten nur selten in den neuralen Entzündungszellinfiltraten beobachtet werden und scheinen ebenso wie in der pankreatischen Neuritis des PCa nur eine marginale Rolle zu spielen (Abb. 5 und Abb.6).

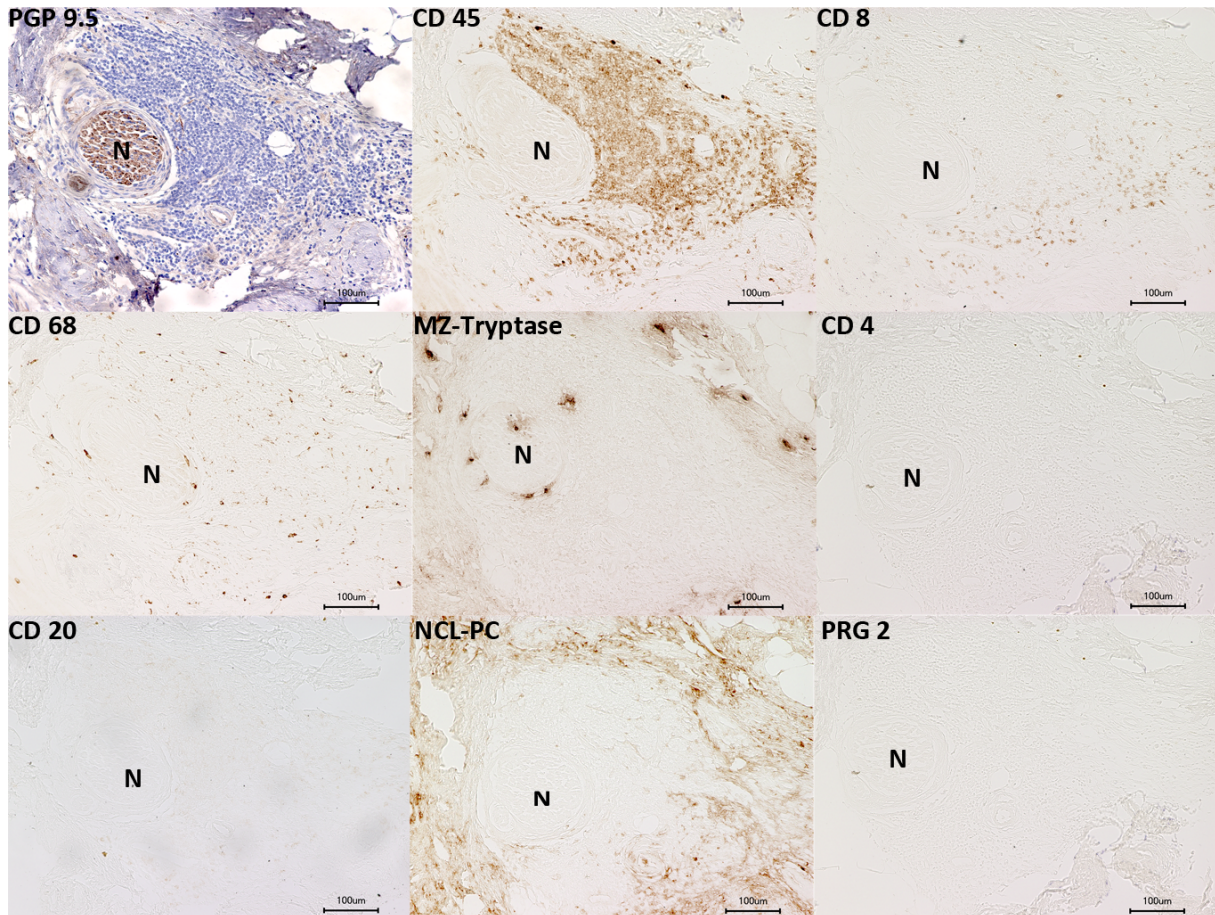


Abb. 4 zeigt die Beteiligung der einzelnen Immunzellenpopulationen an der pankreatischen Neuritis bei Patienten mit CP. Ähnlich wie beim PCa bilden hierbei CD8+ zytotoxische Lymphozyten, CD68+ Makrophagen und Tryptase+ Mastzellen die Mehrheit der Immunzellen. Pro Patient wurden zwischen 3 und 5 Nerven mit Neuritis untersucht.

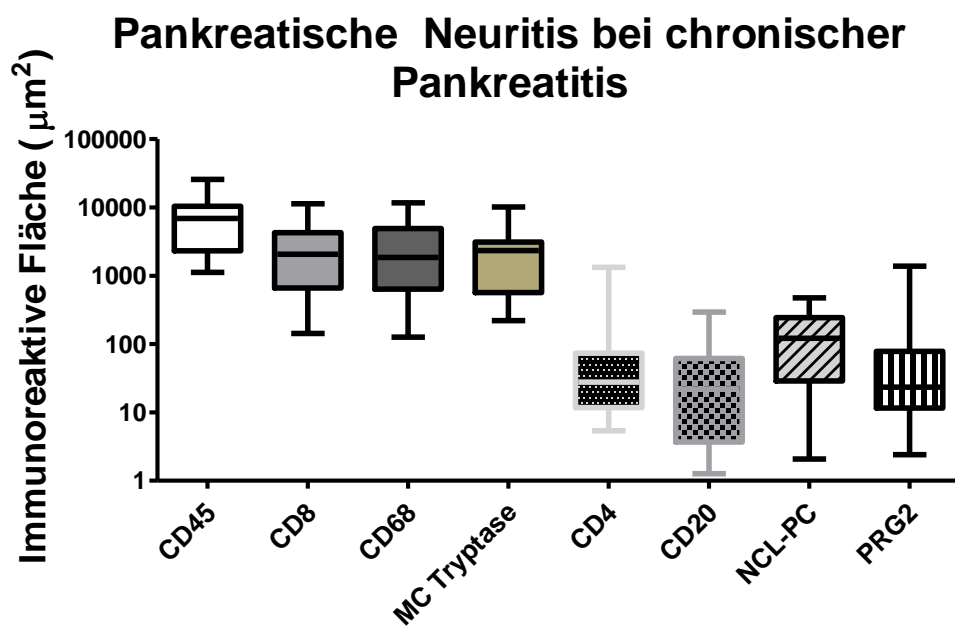


Abb. 5 zeigt die immunoreaktive Fläche der einzelnen Immunzellengruppen bei der pankreatischen Neuritis bei Patienten mit CP. Wie beim PCa stellen CD8+ zytotoxische Lymphozyten, CD68+ Makrophagen und Tryptase+ Mastzellen die Zellpopulationen da, die überwiegend an der Neuritis beteiligt sind.

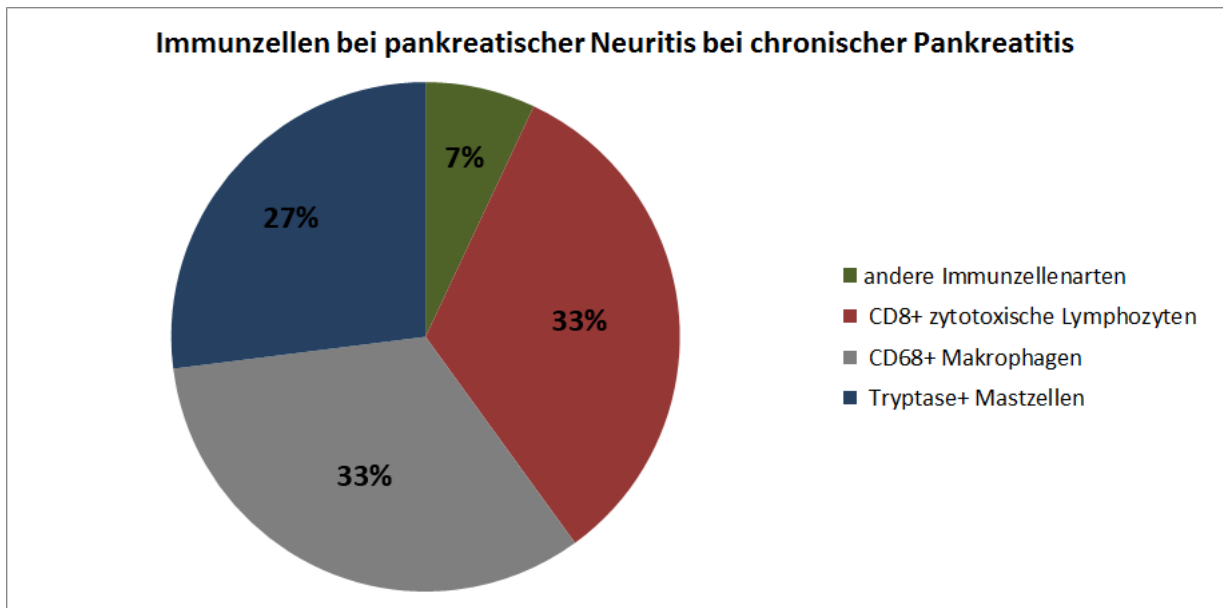


Abb. 6 stellt die prozentuale Verteilung der verschiedenen Immunzellen dar. CD8+ zytotoxische Lymphozyten, CD68+ Makrophagen und Tryptase+ Mastzellen bilden bei CP über 90% der Immunzellen, die bei der pankreatischen Neuritis eine Rolle spielen.

4.2 Der Anteil an Mastzellen in der pankreatischen Neuritis korreliert mit neuropathischen Schmerzen im Pankreaskarzinom.

50% der Patienten mit PCa haben abdominale Schmerzen. Aus diesem Grund spielt die Behandlung dieses Hauptsymptomes eine maßgebliche Rolle. Nicht selten jedoch gestaltet sich diese Therapie als äußerst schwierig und kann oft nur durch hohe Dosen von Analgetika gelindert werden (Ceyhan, Michalski et al. 2008, Ghaneh, Costello et al. 2008). Um neue Erkenntnisse zu bekommen, welche Faktoren an der Entstehung der pankreatischen Schmerzen beteiligt sind, hat die vorliegende Studie neben der Erfassung der einzelnen neuronalen Immunzellsubpopulationen auch das unterschiedliche nervale Infiltrationsmuster auf das Vorhandensein von abdominalen Schmerzen bei Patienten mit PCa untersucht.

Bei einem Vergleich der von CD45+ Immunzellen eingenommenen Fläche bei Patienten mit und ohne Schmerzen fällt auf, dass sich beide Flächen nur in äußerst geringem Maß voneinander unterscheiden. So beläuft sich die Fläche von CD45+ Leukozyten bei Patienten mit abdominalen Schmerzen auf $7574 \mu\text{m}^2$ [$7574 \mu\text{m}^2$ (3121; 36358)], während sie bei Patienten ohne Schmerzsymptomatik $7320 \mu\text{m}^2$ [$7320 \mu\text{m}^2$ (1155; 33793)] betrug (Abb. 8).

Bei der Analyse der einzelnen Immunzellsubgruppen (Abb. 7) konnte eine Umverteilung der Immunzellpopulation beobachtet werden. Besonders auffällig war der unterschiedliche Anstieg der

Mastzellen: Während bei Patienten ohne Schmerzen der prozentuale Anteil der Tryptase+ Mastzellen am entzündlichen Zellinfiltrat bei etwa 13% [13.41% (6.64; 26.29), 777.6 μm^2 (69.93; 3228)] lag, konnte bei Patienten mit Schmerzsymptomatik eine Zunahme auf ca. 31% [30.96% (10.75; 52.10), 3081 μm^2 (21.51; 16090); $p < 0.05$] beobachtet werden (Abb. 7–9). Im Gegensatz hierzu konnte bei allen anderen Immunklassen bei einem Vergleich von den Patienten mit schmerzhaftem und schmerzlosem Pankreaskopftumor kein statistisch signifikanter Unterschied beobachtet werden (Abb. 8 und Abb. 9). So nimmt die Fläche an CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten bei Patienten ohne Schmerzen 39.57% [39.57% (21.06; 54.11), 2208 μm^2 (586.5; 21092)] ein, wohingegen die Fläche bei Patienten mit Schmerzen 32.22% [32.22% (22.62; 42.07), 2802 μm^2 (116; 10933)] betrug (Abb. 8 und Abb. 9). Bei den CD4+ T-Helferzellen konnte ein geringer und statistisch nicht signifikanter Abfall der Fläche von 1.79% [1.79% (0.41; 28.45), 83.03 μm^2 (13.55; 2962)] bei Karzinompatienten ohne Schmerzen auf 1.42% [1.42% (0.39; 15.13), 82.62 μm^2 (30.62; 562.9)] bei Patienten mit Schmerzen beobachtet werden (Abb. 8 und Abb. 9). Ähnlich verhält es sich hinsichtlich der Verteilung der CD68+ Makrophagen und CD20+ B-Lymphozyten: Für CD68+ Makrophagen konnte ein Abfall von 40.99% [40.99% (10.15; 53.00), 2486 μm^2 (665.9; 8097)] in Patienten ohne Schmerzcharakter auf 38.74% [38.74% (21.21; 64.88), 2628 μm^2 (1214; 22012)] bei Patienten mit schmerzhafter Grunderkrankung detektiert werden (Abb. 8 und Abb. 9). Die Fläche der CD20+ B-Lymphozyten verkleinerte sich von 1.1% [1.1% (0.10; 13.84), 83.04 μm^2 (3.06; 418.8)] in Patienten ohne Schmerzen auf 0.77% [0.77% (0.23; 5.11), 70.64 μm^2 (3.36; 2598)] in Patienten mit Schmerzen – jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 8 und Abb. 9). Bei der Fläche der NCL-PC+ Plasmazellen kam es zu einem geringen und statistisch nicht signifikanten Anstieg von ungefähr 0,6% – von 1,46% [1.46% (0.20; 10.54), 69.83 μm^2 (9.50; 597.9)] bei Krebspatienten ohne Schmerzen auf 2,08% [2.08% (0.01; 8.61), 245.4 μm^2 (0.31; 986.9)] bei Patienten mit Schmerzen (Abb. 8 und Abb. 9). Die Fläche der PRG+ eosinophilen Granulozyten blieb annähernd konstant bei 0.53% [0.53% (0.10; 2.44), 26.99 μm^2 (9.93; 156.6)] bzw. 0.50% [0.50% (0.14; 19.77), 48.98 μm^2 (10.75; 888.8)] bei Patienten ohne bzw. bei Patienten mit Schmerzen (Abb. 8 und Abb. 9).

Fasst man die Beobachtungen der Verteilung der perineuralen Entzündungszellen zusammen, so fällt auf, dass sich lediglich der Anteil der perineuralen Mastzellen bei Patienten mit schmerzhafter

Gründerkrankung maßgeblich erhöht. Der Anteil der anderen Immunzellen bleibt hingegen konstant (Abb. 8 und Abb. 9).

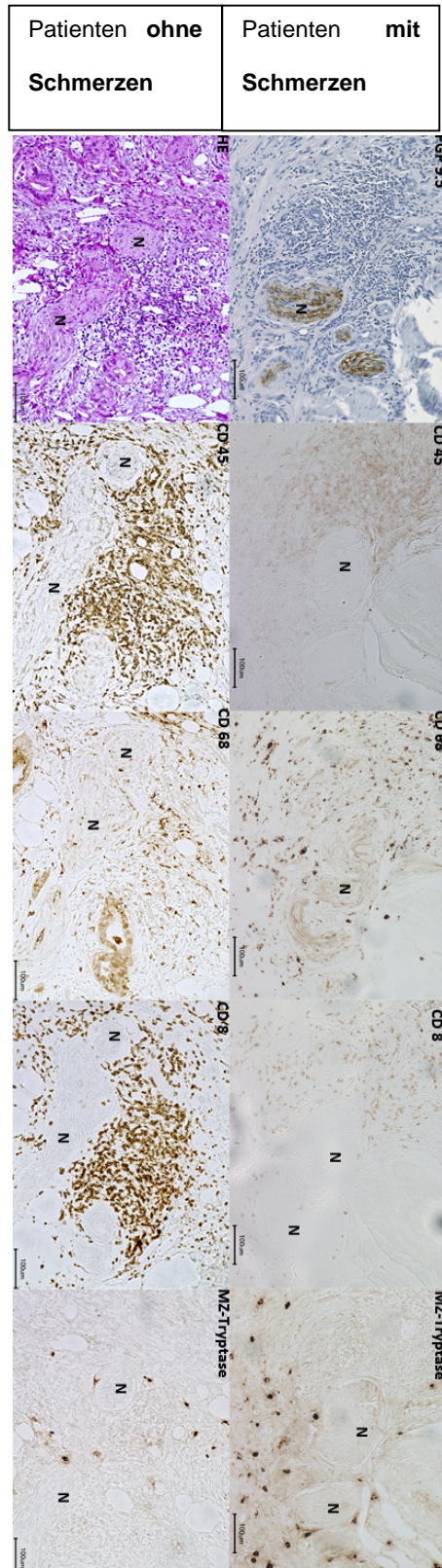
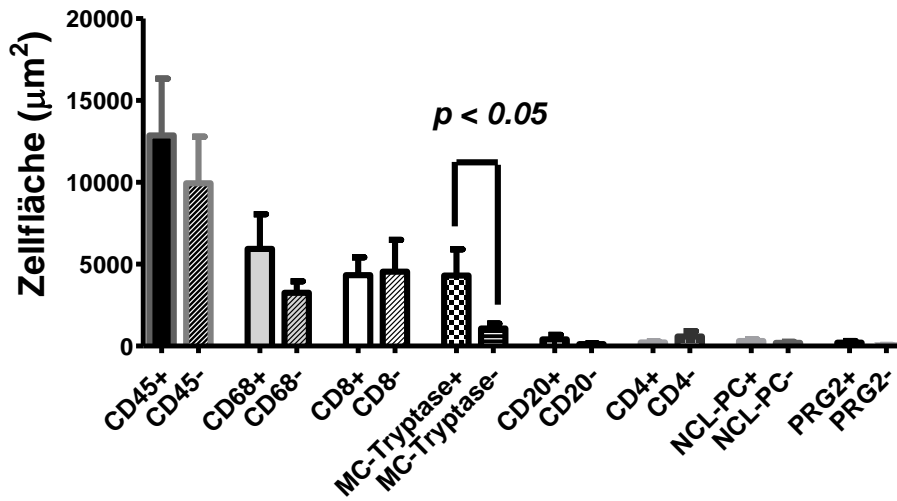
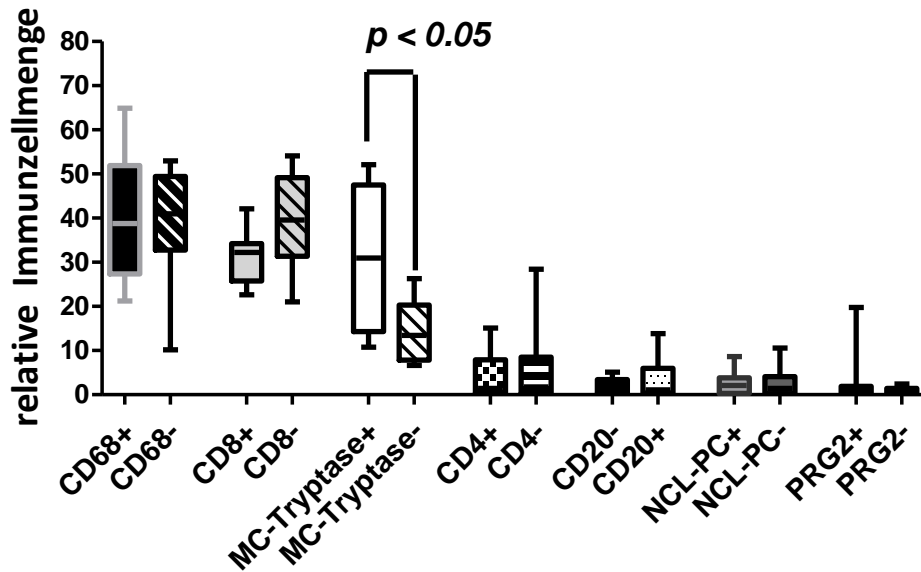


Abb. 7 zeigt die unterschiedliche Verteilung von CD45+ Immunzellen, CD68+ Makrophagen, CD8+ zytotoxischen Lymphozyten und Tryptase+ Mastzellen bei Patienten mit PCa mit und ohne Schmerzen. Ein Vergleich der Immunzellpopulationen zwischen Patienten mit und ohne Schmerzsymptomatik ergab, dass sich bei Patienten mit Schmerzen der Anteil an Tryptase+ Mastzellen vergrößert. Alle anderen Immunzellpopulationen bleiben unverändert.

Immunzellen bei pankreatischer Neuritis beim Adenokarzinom bei Patienten mit (+) und ohne (-) Schmerzen



Relative Immunzellenanzahl bei pankreatischer Neuritis beim Adenokarzinom bei Patienten mit (+) und ohne (-) Schmerzen



In Abb. 8 sind die Fläche und die relative Anzahl der untersuchten Immunzellenpopulationen, die an der pankreatischen Neuritis beteiligt sind, in Abhängigkeit der Schmerzsymptomatik bei Patienten mit PCa (+: Patienten mit Schmerzen; -: Patienten ohne Schmerzen) dargestellt. Bis auf die Fläche der Tryptase+ Mastzellen kommt es zu keiner Veränderung der Zellfläche der anderen Immunzellarten.

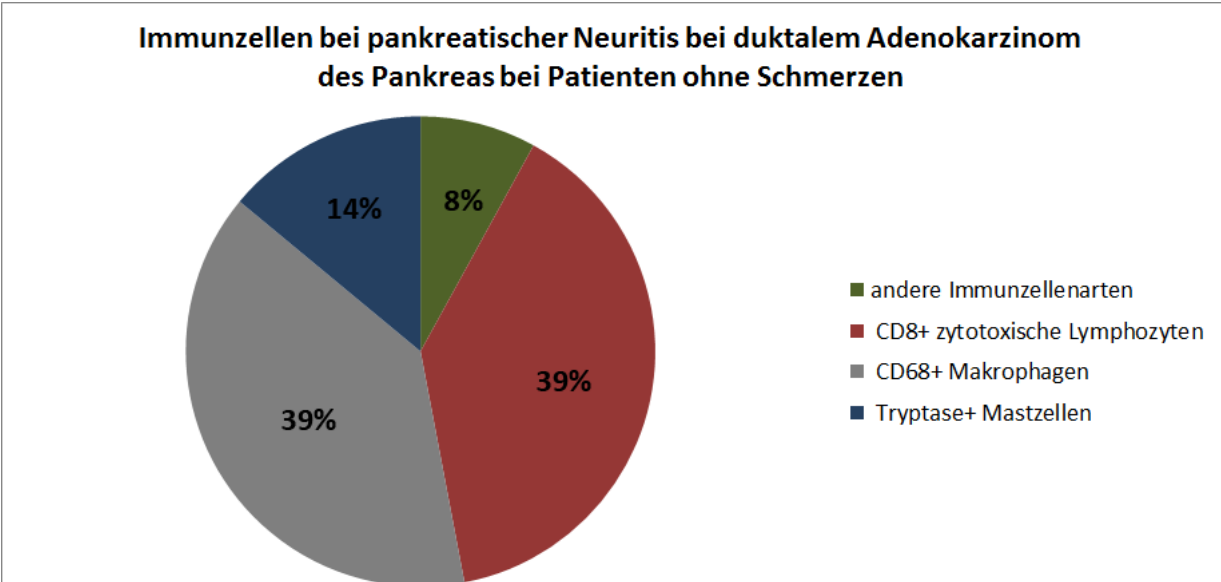
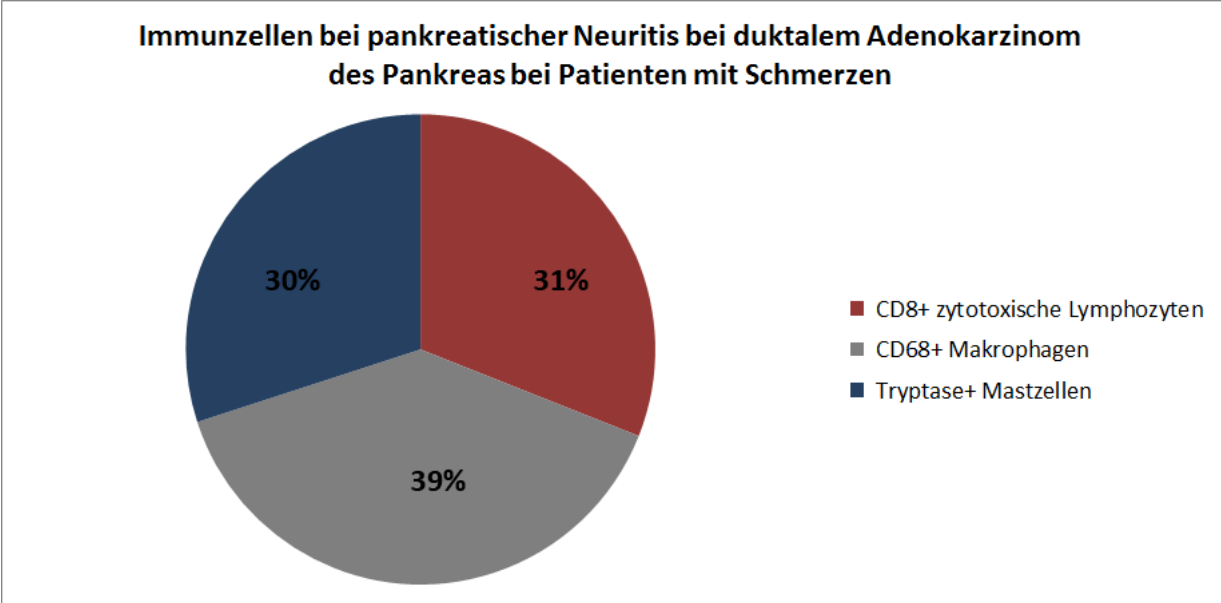


Abb.9 verdeutlicht die relative Veränderung der Hauptimmunzellpopulationen der pankreatischen Neuritis bei Patienten mit PCa mit und ohne Schmerzsymptomatik. Auffällig ist hierbei, dass die Mastzellenpopulation bei Patienten mit Schmerzen mit 30% an der gesamten CD45+ Immunzellenpopulation mehr als doppelt so groß ist wie bei Karzinompatienten ohne Schmerzsymptomatik.

4.3 Der Anteil an Mastzellen an der pankreatischen Neuritis korreliert mit neuropathischen Schmerzen bei Patienten mit chronischer Pankreatitis.

Obwohl das Phänomen der pankreatischen Neuritis bereits Ende der 80er Jahre für die CP entdeckt und beschrieben wurde (Keith, Keshavjee et al. 1985), erfolgte bislang keine Untersuchung des Entzündungsinfiltrates von Patienten mit und ohne Schmerzsymptome. Ähnlich wie beim Karzinom handelt es sich bei den Schmerzen bei CP vorwiegend um neuropathische Schmerzen (Ceyhan, Michalski et al. 2008), die oft bei der Therapie der CP wegen der schwierigen Behandlung das Hauptproblem für die Patienten darstellen und die Lebensqualität entscheidend beeinträchtigen (Braganza, Lee et al. 2011).

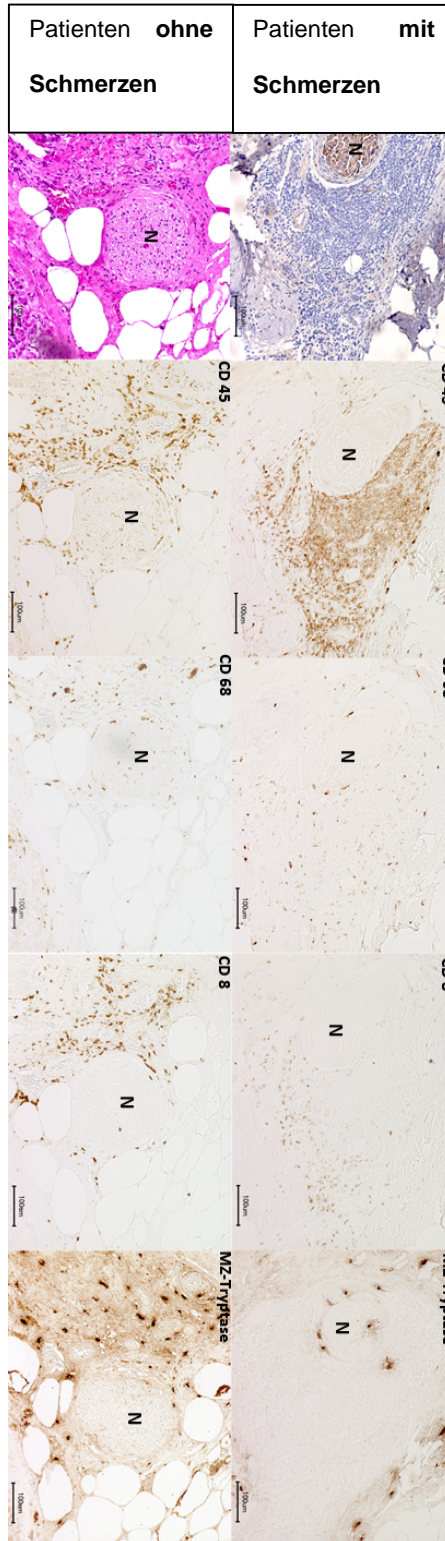
Beim Vergleich der pankreatischen Neuritiden von Patienten mit und ohne Schmerzen fiel eine Abnahme der Fläche der CD45+ Leukozyten bei Patienten mit schmerzhafter CP auf (Abb. 11). So beläuft sich die mediane Fläche der CD45+ Entzündungsinfiltrate bei Patienten mit Schmerzen auf lediglich $4333 \mu\text{m}^2$ (1118; 10375), wohingegen die mediane CD45+ Fläche an der Neuritis beteiligter Entzündungszellen bei Patienten ohne Schmerzbild bei $9831 \mu\text{m}^2$ (1687; 25685) lag (Abb. 11). Die Abnahme des Entzündungsinfiltrates wurde von einer Zunahme der relativen Zellanzahl von Mastzellen bei Patienten mit schmerzhafter chronischer Entzündung begleitet, während sich die absolute Anzahl an Mastzellen nicht signifikant veränderte (Abb. 10-12). So betrug die relative Anzahl der Tryptase+ Mastzellen an der Gesamtanzahl der CD45+ Entzündungszellen bei Patienten mit CP ohne Schmerzen 20.25% [20.25% (1.78; 37.22)], die relative Anzahl der Mastzellen bei Patienten mit Schmerzen jedoch 36.93% [36.93% (10.92; 56.63), $p < 0.05$]. Im Gegensatz dazu konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der absoluten Fläche der Mastzellen zwischen Patienten mit schmerzloser CP [$2833 \mu\text{m}^2$ (221.1; 7396)] und Patienten mit CP und abdominalen Schmerzen [$1546 \mu\text{m}^2$ (455.8; 3129)] festgestellt werden (Abb. 11 und Abb. 12).

Darüber hinaus sank der Anteil der absoluten wie der relativen Anzahl der CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten an der Gesamtzellenpopulation von CD45+ Zellen bei Patienten mit neuropathischen Schmerzen von einer relativen Zellfläche von 37.32% [37.32% (28.31; 48.09)] und einer absoluten Fläche von $3628 \mu\text{m}^2$ [$3628 \mu\text{m}^2$ (653.0; 7365)] bei Patienten ohne Schmerzen auf 22.35% [22.35% (12.27; 28.97), $p < 0.05$] und $768.6 \mu\text{m}^2$ [$768.6 \mu\text{m}^2$ (142.7; 11334)] (Abb. 11 und Abb. 12).

Neben der quantitativen Veränderung der zytotoxischen Lymphozyten und der Mastzellen ergaben sich keine weiteren signifikanten Veränderungen anderer Immunzellsubpopulationen:

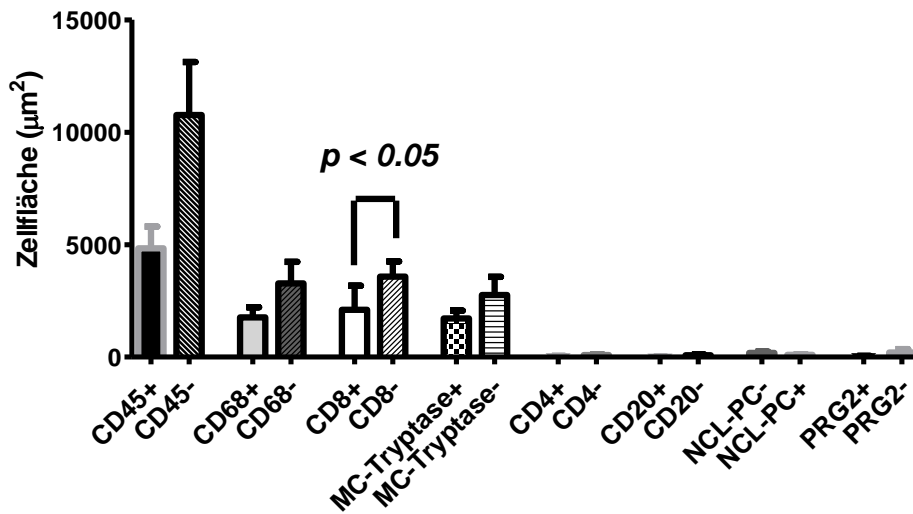
So betrug die Fläche der CD68+ Makrophagen von Patienten mit schmerzloser CP 34.29% [34.29% (1.56; 51.03), 3129 μm^2 (126.9; 6613)] im Vergleich zu 34.40% [34.40% (5.57; 54.22), 1409 μm^2 (546.8; 4811)] bei Patienten mit schmerzhafter chronischer Entzündung (Abb. 11 und Abb. 12). Die relative Anzahl der NCL-PC positiven Plasmazellen an der Gesamtzahl der an der Neuritis beteiligten Entzündungszellen betrug bei Patienten ohne Schmerzen 2.38% [2.38% (0.45; 17.44), 151.5 μm^2 (8.58; 474.3)] und 1.06% [1.06% (0.05; 6.32), 49.05 μm^2 (2.08; 264.0)] bei Patienten mit Schmerzen (Abb. 11 und Abb. 12). Die Fläche von PRG+ eosinophilen Granulozyten am Anteil der pankreatischen Neuritis verringerte sich in Patienten mit schmerzloser Krankheit von 0.94% [0.94% (0.13; 6.24), 39.42 μm^2 (3.34; 1384)] nur geringfügig auf 0.42% [0.42% (0.15; 5.48), 16.22 μm^2 (2.41; 174.1)] bei Patienten mit Schmerzen (Abb. 11 und Abb. 12). Die Menge an CD4+ T-Helferzellen nahm ebenfalls nicht signifikant bei Patienten mit schmerzloser Pankreatitis ab. Bei Patienten mit schmerzhafter CP lag der Anteil von CD4+ Zellen bei 0.87% [0.87% (0.28; 6.22), 46.73 μm^2 (21.97; 351.2)] der an der Neuritis beteiligten Zellen, während es bei Patienten ohne Schmerzen 0.50% [0.50% (0.16; 4.10), 14.47 μm^2 (5.38; 208.3)] war (Abb. 11 und Abb. 12). Eine entsprechend geringe und nicht signifikante Verringerung der Zellenanzahl bei der intrapancreatischen Neuritis konnte auch bei der Analyse der CD20+ B-Zellen beobachtet werden. Dort betrug die Anzahl der B-Zellen bei Patienten mit schmerzhaftem Krankheitsbild 0.76% [0.76% (0.08; 3.19), 61.42 μm^2 (2.57; 293.9)]. Bei Patienten mit schmerzloser Pankreatitis waren es hingegen nur 0.50% [0.50% (0.07; 1.65), 7.07 μm^2 (1.27; 40.86)] (Abb. 11 und Abb. 12).

Ebenso wie bei Patienten mit PCa kommt es bei Patienten mit schmerzhafter chronischer Entzündung lediglich zu einem Anstieg der Mastzellfraktion (Abb. 11 und Abb. 12). Alle anderen Immunzellklassen blieben in ihrer Verteilung bei einem Vergleich zwischen schmerzhafter und schmerzloser Grunderkrankung konstant oder zeigten sogar einen Abfall bei der perineuralen Neuritis (Abb. 11 und Abb. 12).



In **Abb. 10** sind immunhistologische Bilder von Neuritis von Patienten mit CP mit oder ohne Schmerzen abgebildet. Im Gegensatz zu CD68+ Makrophagen, deren Anteil an der Neuritis bei einem Vergleich der beiden Patientengruppen konstant bleibt, zeigen Patienten mit abdominalen Schmerzen einen kleineren Anteil an CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten bei einer Vergrößerung der Mastzellpopulation.

**Immunzellen bei pankreatischer Neuritis bei
chronischer Pankreatitis bei Patienten mit (+) und
ohne (-) Schmerzen**



**Relative Immunzellenanzahl bei pankreatischer
Neuritis bei chronischer Pankreatitis bei Patienten mit
(+) und ohne (-) Schmerzen**

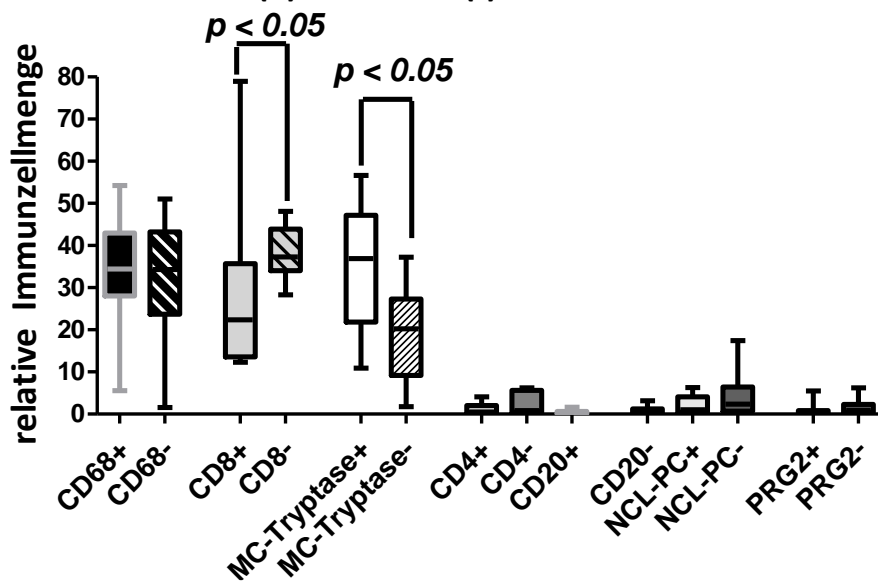
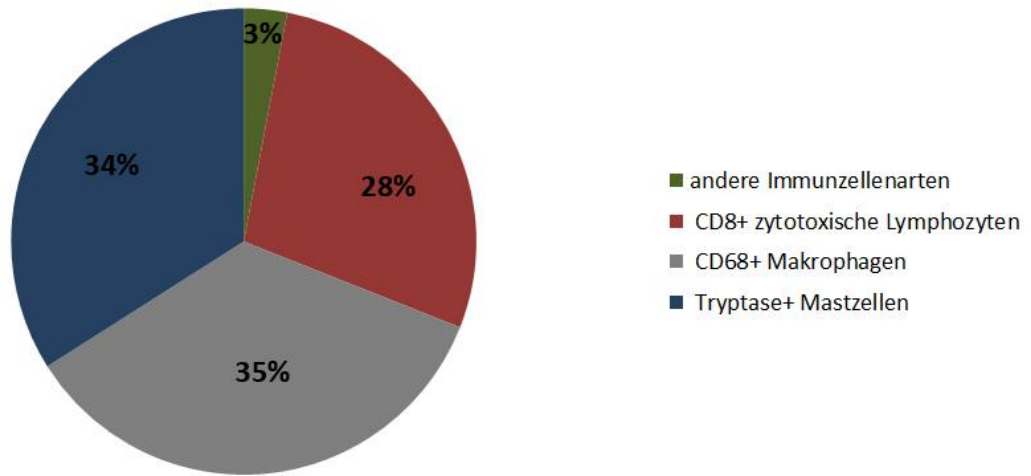
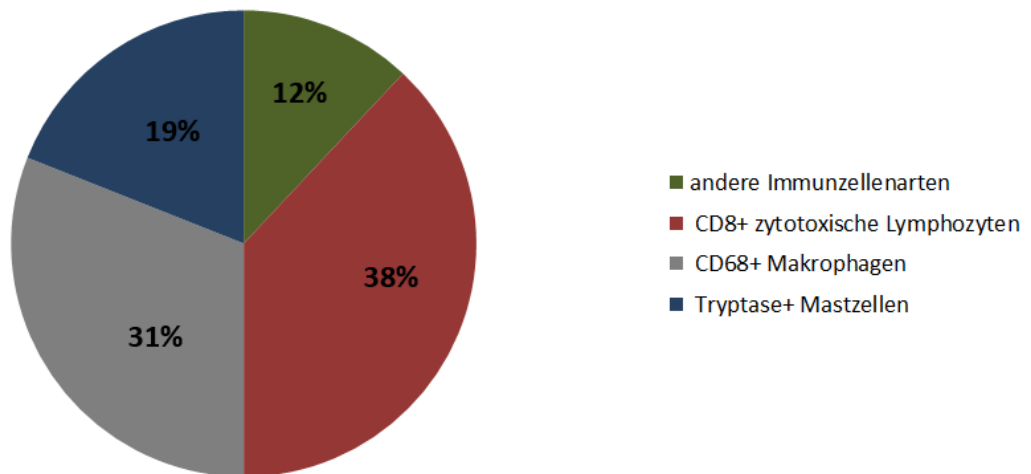


Abb. 11 zeigt die Fläche und den prozentualen Anteil der unterschiedlichen Immunzellpopulationen an der pankreatischen Neuritis bei CP. Man kann bei einem Vergleich der Patienten mit und ohne Schmerzen feststellen, dass bei Patienten mit Schmerzen die Fläche von CD8+ T-Lymphozyten und Tryptase+ Mastzellen signifikant kleiner als die bei schmerzloser CP ist. Bei einem Vergleich der relativen Zahlen fällt hingegen auf, dass zwar die Anzahl an zytotoxischen Lymphozyten verringert ist, der prozentuale Anteil an Mastzellen bei Patienten mit abdominalen Schmerzen jedoch signifikant erhöht ist.

Immunzellen bei pankreatischen Neuritiden bei chronischer Pankreatitis bei Patienten mit Schmerzen



Immunzellen bei pankreatischen Neuritiden bei chronischer Pankreatitis bei Patienten ohne Schmerzen



In **Abb. 12** ist der relative Anteil der Immunzellen abgebildet, die an der Neuritis bei CP beteiligt sind. Ebenso wie bei Patienten mit PCa und abdominalen Schmerzen ist bei Patienten mit CP der Anteil an Tryptase+ Mastzellen im Vergleich zu Patienten ohne Schmerzsymptomatik signifikant erhöht. Die Anzahl an CD8+, zytotoxischen T-Lymphozyten ist hingegen bei Patienten mit Schmerzen signifikant erniedrigt.

4.4 Die neurale Invasion von Karzinomzellen im Pankreaskarzinom korreliert nicht mit der neuralen Infiltration von Mastzellen.

Die neurale Invasion von Tumorzellen in Nerven stellt eine bedeutende histologische Besonderheit des PCa dar (Bockman, Buchler et al. 1994) und ist mit einer Verkürzung der Disease-Free-Survival-Zeit sowie mit einer verkürzten Lebenserwartung vergesellschaftet (Chatterjee, Katz et al. 2012).

Mit der signifikanten Zunahme von Mastzellen in der pankreatischen Neuritis bei PCa-Patienten stellt sich auch die Frage, ob das Ausmaß der Tumordinfiltration der Nerven mit dem unterschiedlichen Auftreten von Mastzellen verbunden ist. Hierzu wurde die Infiltrationstiefe von Tumorzellen in drei unterschiedliche Schweregrade unterteilt. Dabei entspricht Grad 0 keiner Infiltration, Grad I einer perineuralen Invasion von Tumorzellen in Nervenfasern und Grad II einer endoneuralen Invasion (Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Erneut wurde die relative Fläche der Tryptase+ Mastzellen im Verhältnis zu der Gesamtanzahl der CD45+ Immunzellen erfasst und mit dem unterschiedlichen Invasionsgrad der Tumorzellen korreliert.

Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Mastzellen bei pankreatischer Neuritis und dem Schweregrad der neuralen Invasion konnte dabei nicht festgestellt werden [Grad 0 (keine Invasion von Tumorzellen): 15.73% (3.08; 65.16), Grad I (perineurale Invasion von Tumorzellen): 14.79% (0.34; 51.71) und Grad II (endoneurale Invasion von Tumorzellen): 37.67% (17.65; 60.05), $p = 0.08$] (Abb. 13).

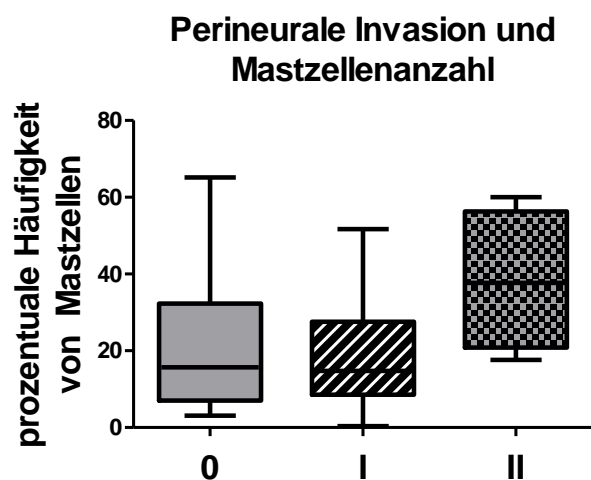


Abb. 13 zeigt den Zusammenhang zwischen dem Grad der neuralen Invasion von Tumorzellen im PCa (Grad 0 = keine Invasion; Grad I = perineurale Invasion; Grad II = endoneurale Invasion) in Abhängigkeit zur relativen Häufigkeit von Mastzellen. Hierbei konnte kein Zusammenhang zwischen dem Grad der Invasion und dem gehäuften Auftreten von Mastzellen beobachtet werden.

4.5 Die Protease-Aktivierten-Rezeptoren PAR-1 und PAR-2 haben keinen Einfluss auf die neuropathischen Schmerzen in der chronischen Pankreatitis und im Pankreaskarzinom.

Die Protease-Aktivierten-Rezeptoren Typ-1 (PAR-1) und Typ-2 (PAR-2) spielen insbesondere bei der Sensibilisierung von Neuronen eine große Rolle. Durch seine Fähigkeit, sich als Ligand an den PAR-1 Rezeptor zu binden und ihn zu aktivieren, ist Thrombin in der Lage, eine Sensibilisierung von Neuronen hervorzurufen und dadurch Einfluss auf die nozizeptive Wahrnehmung zu nehmen (Narita, Usui et al. 2005). Von Mastzellen sezernierte Tryptase ist hingegen in der Lage, sich spezifisch an PAR-2 Rezeptoren zu binden und Nervenfasern bezüglich äußerer Stimulantien zu sensibilisieren (Lam and Schmidt 2010, Oliveira, Silva et al. 2013, Poole, Amadesi et al. 2013). Nach der Entdeckung des Anstiegs der Mastzellenanzahl in Patienten mit schmerzhafter Grunderkrankung stellte sich die Frage, ob sich die Expression bei Gewebe von Patienten mit CP und PCa im Vergleich zu Gewebe von gesunden Patienten ändert und ob es zu einer Änderung des Expressionsniveaus bei Patienten mit und ohne Schmerzsymptomatik kommt. Für die vollständige Erfassung der Rezeptordichte erfolgte die Überprüfung mittels qrt-PCR auf RNA-Ebene. Die regionale Verteilung der PAR-Rezeptoren wurde mittels Immunhistochemie überprüft und analysiert.

Bei einem Vergleich der Expressionsniveaus von PAR-1 Rezeptoren im Gewebe von Patienten mit gesundem Pankreas und im Gewebe von Patienten mit CP oder PCa zeigte die Analyse der mRNA-Level keine signifikanten Unterschiede (Abb. 14). Nachdem keine signifikante Veränderung der PAR-1-Rezeptoren-mRNA innerhalb der unterschiedlichen Gewebe festgestellt werden konnte, blieb weiterhin die Frage offen, inwiefern sich das Expressionsniveau von PAR-1 Rezeptoren bei Patienten mit abdominalen Schmerzen im Vergleich zu Patienten ohne Schmerzsymptome ändert. Eine Untersuchung der Patienten mit CP bzw. mit PCa sowie mit und ohne abdominaler Schmerzen ergab jeweils ähnliche mRNA-Level ohne signifikanten Unterschied (Abb. 15 und Abb. 16).

Zusätzlich zu den PAR-1 Rezeptoren sind auch die PAR-2 Rezeptoren an der Sensibilisierung von Neuronen und somit an der Wahrnehmung und Entstehung von Schmerzen beteiligt (Steinhoff, Vergnolle et al. 2000, Lam and Schmidt 2010, Oliveira, Silva et al. 2013, Poole, Amadesi et al. 2013). Wegen der quantitativen Veränderung der Mastzellen bei Patienten mit Schmerzen und der Fähigkeit

von Mastzellen, sezerniertes Trypsin als Ligand an die PAR-2 Rezeptoren zu binden, lag die Analyse der Expressionslevel von PAR-2 nahe. Hierzu wurde ebenso wie bei der Analyse der PAR-1 Rezeptor- endichte auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR überprüft, um eine Regulation im gesamten Gewebe zu untersuchen und um mittels Immunhistochemie die regionale Verteilung der Rezeptoren innerhalb des Gewebes zu analysieren. Ähnlich wie bei der Analyse der PAR-1 Rezeptoren konnte beim Vergleich der PAR-2-Rezeptoren-mRNA-Level zwischen den einzelnen Gewebetypen von Patienten mit CP, PCa und normalem Pankreas kein Unterschied in der Expression zwischen den Geweben gefunden werden (Abb. 14). Ebenso konnte keine signifikante Veränderung der Rezeptorendichte bei einem Vergleich von Patienten mit und ohne Schmerzen beobachtet werden (Abb. 15 und Abb. 16).

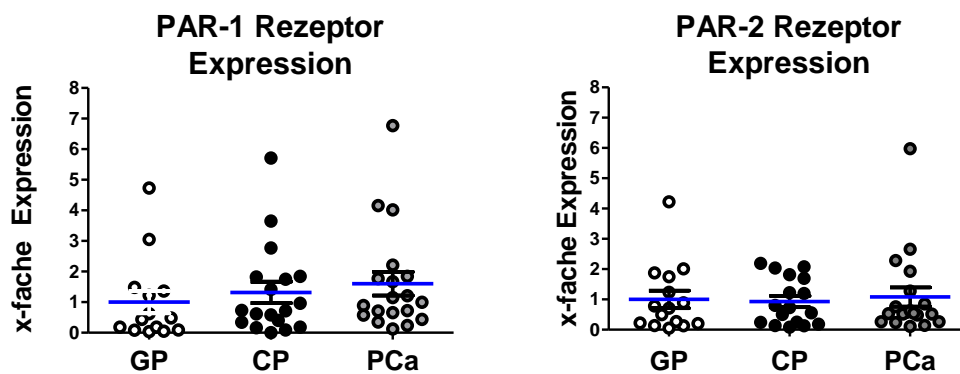
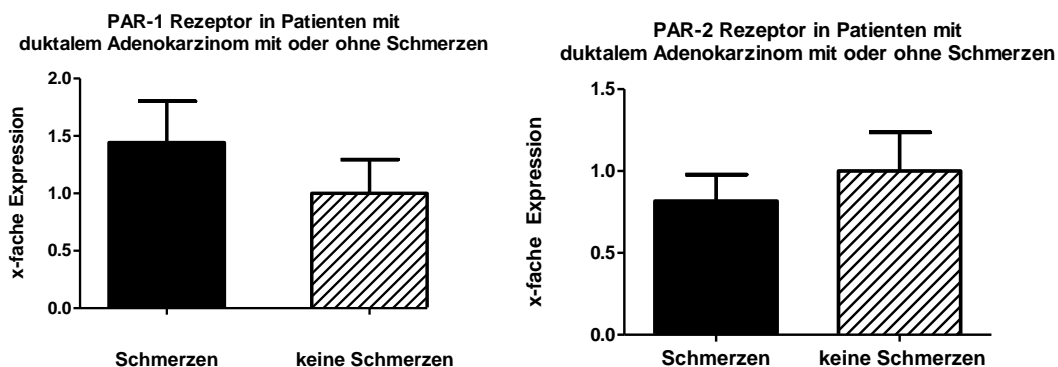


Abb. 14 zeigt das Ergebnis der quantitativen PCR: Es konnte weder ein Unterschied in der Expression von PAR-1 Rezeptoren noch von PAR-2 Rezeptoren in Gewebe von Patienten mit gesundem Pankreas (GP), Patienten mit CP (CP) oder in Gewebe von Patienten mit PCa festgestellt werden.



In Abb. 15 ist die Expression von PAR-1 und PAR-2 Rezeptoren in Gewebe von Karzinompatienten mit oder ohne abdominale Schmerzen abgebildet. Sowohl bei PAR-1 Rezeptoren als auch bei PAR-2 Rezeptoren konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der Expression beobachtet werden.

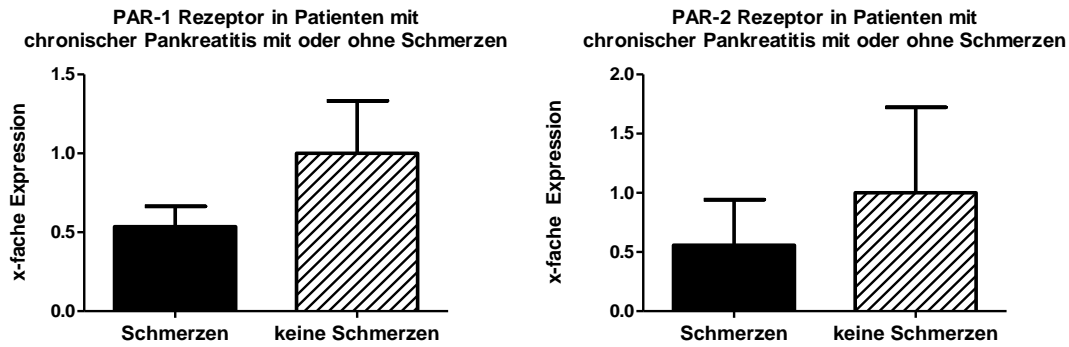
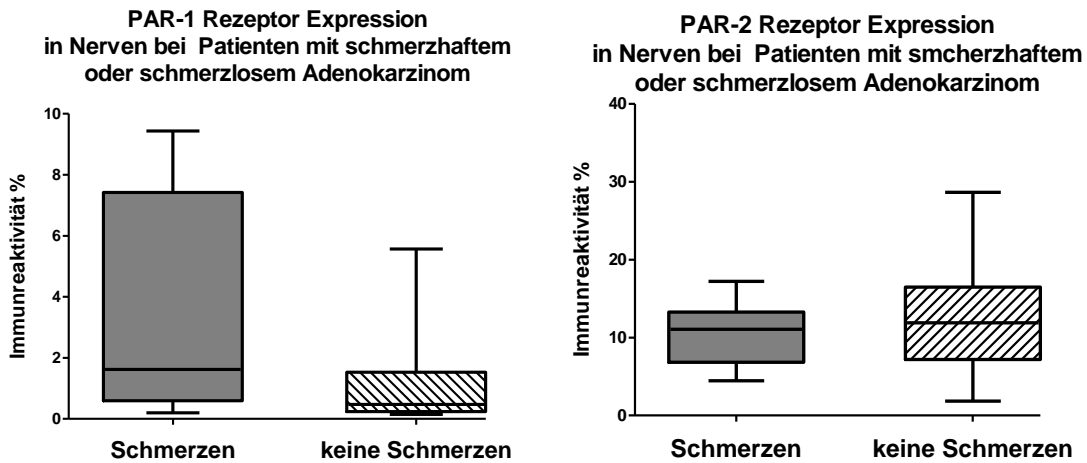


Abb. 16 gibt einen Überblick über die Expression von PAR-1 und PAR-2 Rezeptoren bei Patienten mit CP mit oder ohne abdominale Schmerzen. Ein Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen konnte dabei nicht festgestellt werden.

Die anschließende Untersuchung der intraneuralen Rezeptoren auf Proteinebene bei den Patientengruppen mit und ohne Schmerzsymptome ergab, dass es bei Patienten mit schmerzhaftem PCa zu einer leichten Zunahme der Rezeptordichte kam, wenngleich eine signifikante Änderung nicht festgestellt werden konnte. So betrug der Anteil der intraneuralen PAR-1-Immunreaktion bei Patienten mit schmerzhaftem PCa rund 1,62% [1,62% (0,198; 9.44)], bei Patienten mit schmerzloser Raumforderung lediglich etwas mehr als 0,4% [0,476% (0.14; 5.57)] (Abb. 17).

Die Immunreaktivität von PAR-2 in Nerven von Patienten mit schmerzhaftem oder schmerzlosem PCa war ohne Unterschied [11.06% (4.45; 17.23) bei Patienten mit schmerzhaftem PCa gegenüber 11.90% (1.843; 28.64) bei Patienten ohne Schmerzen] (Abb. 17).

Jedoch ergab die Analyse der Immunreaktivität von PAR-1 in Patienten mit schmerzloser und schmerzhafter chronischer Entzündung keinen Unterschied. So betrug die mediane intraneurale Fläche der PAR-1-Reaktion bei Patienten mit pankreatischen neuropathischen Schmerzen 0,388% [0,388% (0,0419; 1,9)] gegenüber 0,37 % [0,37 (0,028; 2,63)] bei Patienten mit CP ohne Schmerzcharakter (Abb. 18). Die Immunreaktivität von PAR-2 ergab bei den Patienten mit CP ähnlich wie bei den Gewebeproben der Patienten mit PCa unabhängig von der Schmerzsymptomatik keinen signifikanten Unterschied (Abb. 18).



In **Abb. 17** wird die intraneurale Rezeptordichte von PAR-1 und PAR-2 Rezeptoren bei Patienten mit PCa abgebildet. Eine Untersuchung der Patienten bezüglich der intraneuralen Expression von PAR-1 und PAR-2 Rezeptoren und dem Auftreten von abdominalen Schmerzen erbrachte keinen statistisch signifikanten Unterschied.

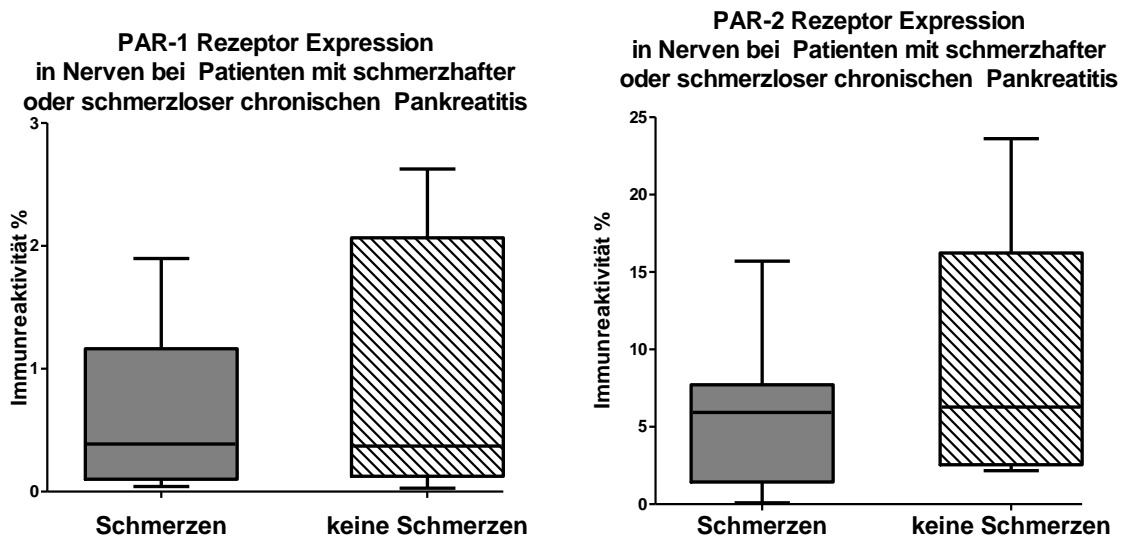


Abb. 18 stellt die prozentuale Verteilung der intraneuralen Rezeptordichte von PAR-1 und PAR-2 Rezeptoren bei Patienten mit schmerzhafter oder schmerzloser CP dar. Eine Korrelation zwischen Schmerzen und Rezeptordichte konnte hierbei nicht beobachtet werden.

4.6 Mastzellen in Patienten mit Pankreaskarzinom/chronischer Pankreatitis und neuropathischen Schmerzsyndrom enthalten Tryptase und Chymase.

Mastzellen im menschlichen Körper können nach dem Inhalt ihrer Granula in zwei Hauptgruppen unterteilt werden. Dabei existiert einerseits der Mastzell-Tryptase (MC_T)-Typ, welcher vorwiegend Tryptase und Heparin in den Granula beinhaltet und sekretiert, und andererseits der Mastzell-Tryptase/Chymase (MC_{TC})-Typ, welcher zusätzlich zu den oben genannten Mediatoren auch das proteolytische Enzym Chymase sezernieren kann (Galli, Borregaard et al. 2011). Um eine Aussage über den vorherrschenden Mastzelltyp treffen zu können, wurden die Mastzellen in Präparaten von Patienten mit CP, PCa und Gewebe von Patienten mit normalem Pankreasgewebe via Doppel-Immunfluoreszenzhistologie gegen Mastzelltryptase und -chymase gefärbt.

Wie erwartet, konnten in normalem Pankreasgewebe nur äußerst geringe Mengen an Mastzellen um intrapankreatische Nerven vorgefunden werden. Insgesamt wurden Gewebepreparate von 16 Patienten mit normalem Pankreas eingefärbt. Hierbei zeigte sich nur bei 3 Nerven eine engere räumliche Anordnung von Mastzellen um intrapankreatische Nerven. Die Untersuchung des Mastzellsubtyps ergab, dass bei gesundem Gewebe alle Mastzellen sowohl Tryptase als auch Chymase positiv [100% (100; 100)] sind und es sich somit um Mastzellen des MC_{TC} -Typs handelt (Abb. 20 und Abb. 21).

Bei der immunologischen Untersuchung der Gewebe aus Patienten mit CP und PCa fiel auf, dass der Großteil der Mastzellen, die bei der pankreatischen Neuritis eine Rolle spielen, ebenfalls dem MC_{TC} -Typ zugeordnet werden konnten ($81.7 \pm 4.9\%$ beim PCa und $77.0 \pm 4.0\%$ bei CP) (Abb. 18, Abb. 19 und Abb. 21). Im Gegensatz zu den Geweben aus gesunden Organen können in den beiden anderen pathologischen Geweben neben den Tryptase/Chymase positiven Mastzellen auch Mastzellen gefunden werden, die nur eine Tryptase positive Immunreaktion zeigten und folglich dem MC_T -Typ angehörten ($18.3 \pm 4.9\%$ beim PCa und $23.7 \pm 4.0\%$ bei der CP) (Abb. 21).

Eine Zuordnung der einzelnen Mastzellensubtypen in Gewebeproben von Patienten mit schmerzhaftem oder schmerzlosem Pankreaskopftumor ergibt dabei eine ähnliche Verteilung der einzelnen Mastzellarten in den zwei Patientengruppen. So sind etwas mehr als 85% der Mastzellen bei Karzinompatienten mit Schmerzen vom MC_{TC} -Typ ($85.6 \pm 6.4\%$) und etwas mehr als 14% vom MC_T -

Typ ($14.4 \pm 6.4\%$) (Abb. 22). In Patienten ohne Schmerzen sind dagegen nur ca. 77% der Mastzellen vom MC_{TC} -Typ ($77.4 \pm 7.4\%$) und ca. 22% zum MC_T -Typ ($22.6 \pm 7.4\%$) (Abb. 18 und Abb. 22).

Vergleicht man hingegen die Anzahl der Mastzellen des MC_{TC} -Typs und des MC_T -Typs bei Patienten mit CP mit und ohne Schmerzen, fällt ein deutlicher und signifikanter Anstieg der doppelpositiven Mastzellen im Patientenkollektiv mit Schmerzen auf (Abb. 19 und Abb. 22). Während lediglich 63% aller Mastzellen in Patienten mit CP ohne Schmerzcharakter eine Doppelfärbung von Chymase und Tryptase aufwiesen und somit dem MC_{TC} -Typ zugeordnet wurden ($62.9 \pm 6.4\%$), zeigten 37% der Mastzellen eine singuläre Tryptase-Immunreaktivität ohne Chymaseanteil ($37.1 \pm 6.4\%$). Die Anzahl des MC_{TC} -Typs belief sich in Patienten mit Schmerzen auf fast 87% ($86.9 \pm 4.4\%$). Der Anteil der Mastzellen von MC_T -Typ betrug 13% ($13.1 \pm 4.3\%$, $p < 0.0001$) (Abb. 19 und Abb. 22).

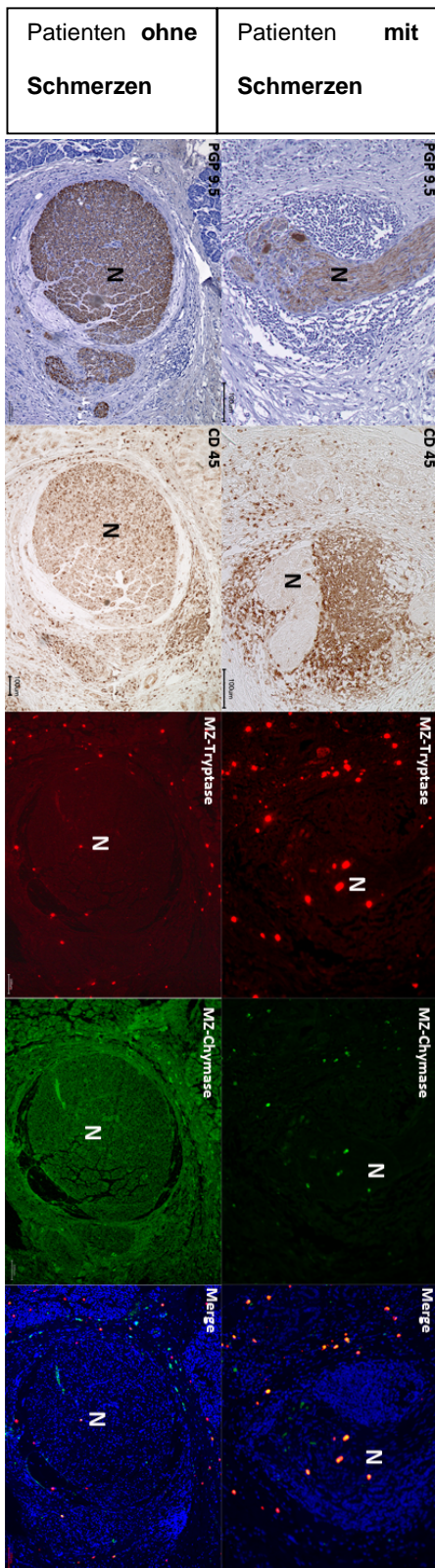


Abb. 18 gibt einen Überblick über die Verteilung von Chymase+ (grün), Tryptase+ (rot) und doppelpositiven (orange) Mastzellen bei Neuritiden in Patienten mit PCa. Bei einem Vergleich der Karzinompatienten mit abdominalen Schmerzen mit Patienten ohne Schmerzen konnten bei Patienten mit Schmerzen vermehrt doppelpositive Mastzellen beobachtet werden ($p > 0,0001$).

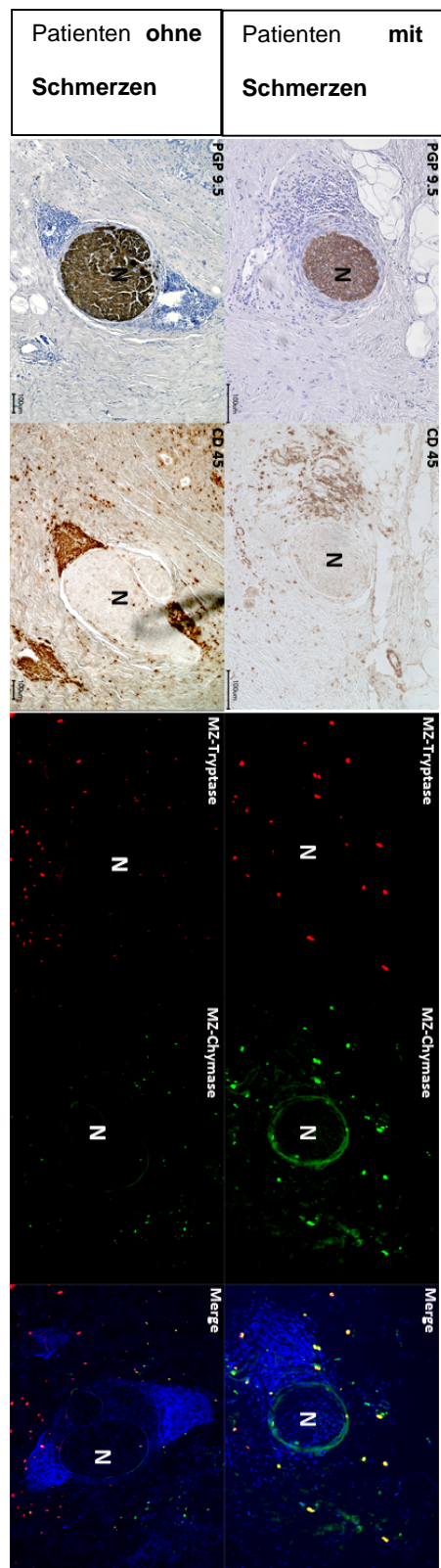
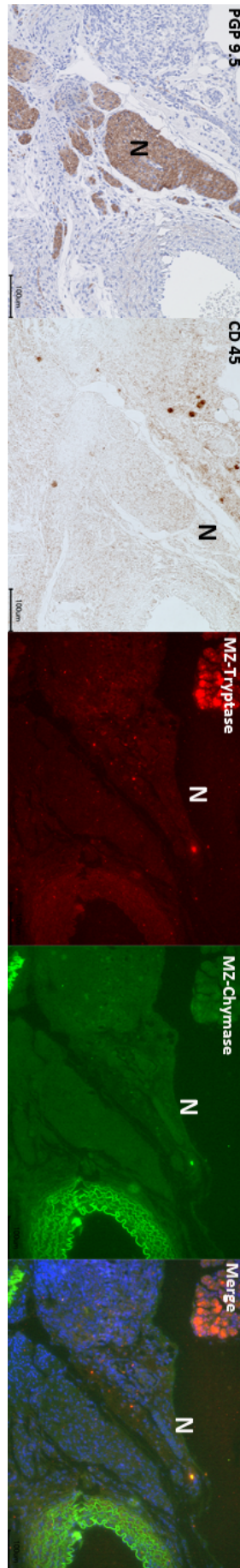


Abb. 19 zeigt die Verteilung von Chymase+ (grün), Tryptase+ (rot) und doppelpositiven (orange) Mastzellen bei Neuritiden in Patienten mit CP. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit und ohne Schmerzen konnte dabei nicht festgestellt werden.



In **Abb. 20** wird das Auftreten von Chymase+ (grün), Tryptase+ (rot) und doppelpositiven (orange) Mastzellen bei Patienten mit gesundem Pankreas gezeigt. In diesem Gewebe wurden vorwiegend Mastzellen vom MC_T-Typ beobachtet. Nur vereinzelt konnten Tryptase+/Chymase- - Mastzellen im Gewebe beobachtet werden.

Perineurale Mastzellen in den unterschiedlichen Geweben

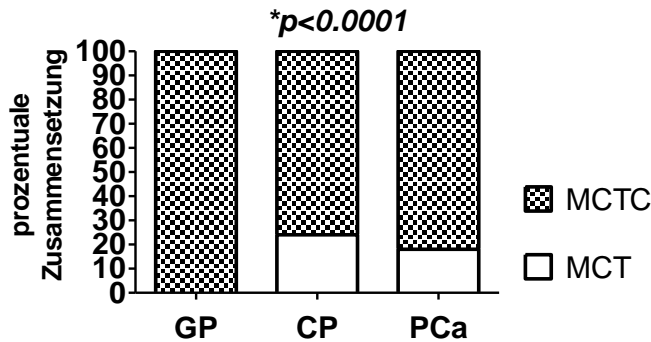
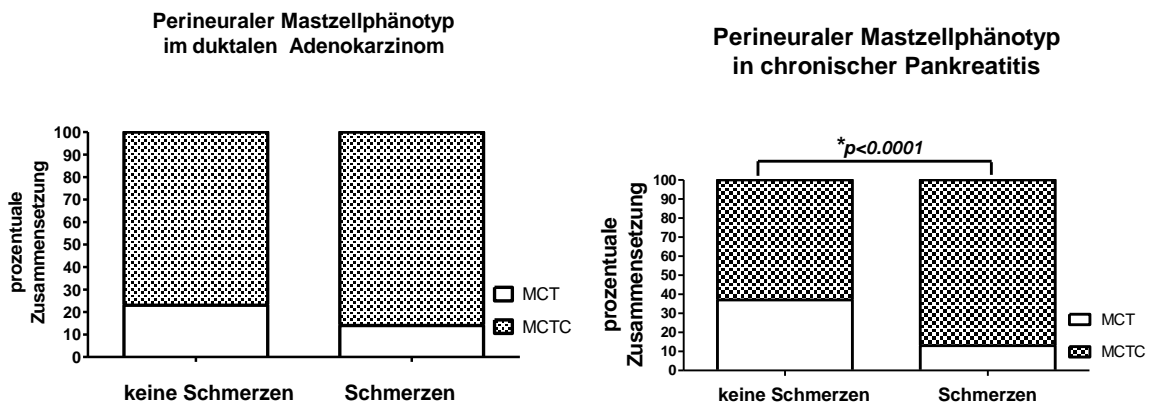


Abb. 21 gibt die unterschiedliche Verteilung der Mastzellphänotypen wieder. Auffallend ist, dass im gesunden Gewebe nur der MC_{TC} -Typ vorkommt. Bei CP und auch beim PCa existiert neben dem MC_{TC} -Typ auch noch der MC_T -Typ.



In Abb. 22 wird der prozentuale Anteil der Tryptase/Chymase+ Mastzellen (MC_{TC}) und Tryptase-/Chymase- (MC_T) im PCa (links) und in der CP (rechts) gezeigt. Während bei einem Vergleich zwischen den Geweben aus Karzinompatienten mit oder ohne Schmerzen kein Unterschied des Mastzellphänotyps festgestellt werden konnte, war der Anteil von Tryptase+/Chymase+ Mastzellen bei Patienten mit schmerzhafter CP gegenüber schmerzloser CP signifikant erhöht.

Nach der Analyse der Mastzellsubgruppen und dem Ergebnis, dass bei CP und PCa vorwiegend der MC_{TC} -Typ vorzufinden ist, stellte sich die Frage, ob es zu einer Veränderung der perineuralen Chymaseimmunoreaktivität bei Patienten mit und ohne Schmerzen kommt. Hierzu bot sich die Bestimmung der Immunreaktivität von Chymase in Mastzellen an und deren Vergleich bei den Patientengruppen mit und ohne Schmerzen (Abb. 23). Dabei zeigte sich, dass es in beiden Krankheitsbildern bei Patienten mit

Schmerzen zu einem signifikanten Anstieg der Immunreaktivität gegen Chymase in Mastzellen kommt. So stieg der Anteil an Chymase in Mastzellen bei Patienten mit PCa bzw. CP ohne Schmerzen von 0.75% [0,75% (0.04; 8.71)] bzw. 0.65% [0.65% (0.01; 7.87)] auf 8.73% [8.73% (2.53; 16.82)] bzw. 3.70% [3,70% (0.10; 41.26)] bei Patienten mit Schmerzen ($p < 0.05$) (Abb. 23).

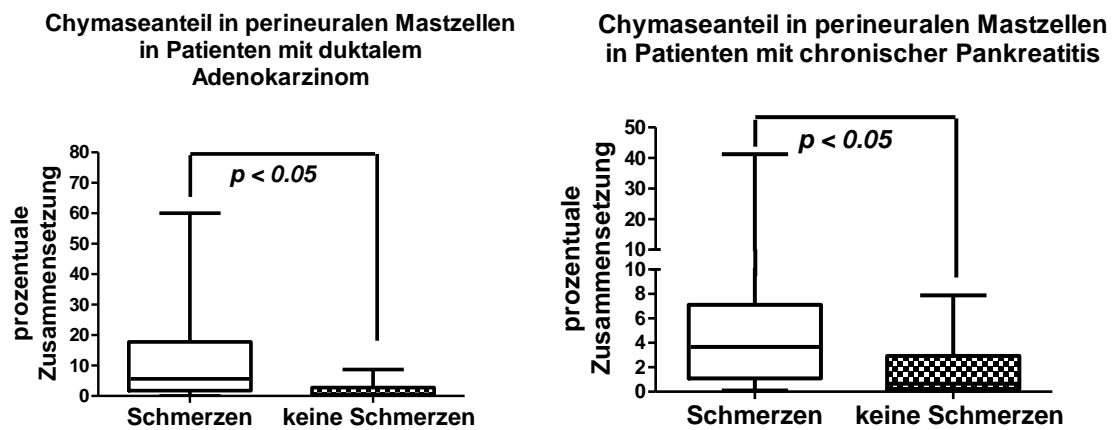


Abb. 23 zeigt die prozentuale Verteilung von Chymase in perineuralen Mastzellen. Beim Vergleich der Patienten mit PCa (links) bzw. CP (rechts) mit und ohne Schmerzen konnte ein erhöhter und statistisch signifikanter Chymase-Anteil in Mastzellen bei Patienten mit schmerzhafter Grunderkrankung festgestellt werden.

5. Diskussion

Das Auftreten von pankreatischer Neuritis ist mit einer Vielzahl von Komplikationen und histologischen Veränderungen vergesellschaftet. So ist das Vorhandensein der pankreatischen Neuritis nicht nur im PCa, sondern auch in der CP direkt mit der Stärke und der Frequenz von abdominalen Schmerzen assoziiert (Di Sebastiano, Fink et al. 1997, Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Darüber hinaus korreliert das Auftreten der pankreatischen Neuritis mit histologischen Veränderungen im Pankreas, wie etwa einer Zunahme von Nervenanzahl und Nervendurchmesser (Ceyhan, Bergmann et al. 2009, Ceyhan, Demir et al. 2010). Obwohl das Auftreten von Entzündungszellen und die Bildung von neuralen Entzündungszellinfiltraten schon relativ lange in der CP und kürzlich im PCa bekannt sind (Keith, Keshavjee et al. 1985, Bockman, Buchler et al. 1988, Bockman, Buchler et al. 1994, Ceyhan, Bergmann et al. 2009) erfolgte bislang keine Charakterisierung und Analyse der einzelnen Immunzellsubtypen der pankreatischen Neuritis.

Aus diesem Grund war das Hauptziel vorgelegten Dissertationsarbeit die Verteilung der einzelnen Immunzellsubtypen der pankreatischer Neuritis im PCa und der CP im Detail aufzuschlüsseln. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Entzündungsfoci um die intrapancreatischen Nerven bei beiden Erkrankungen vorwiegend aus zytotoxischen T-Lymphozyten, Mastzellen und Makrophagen bestehen. Andere Immunzellarten konnten dagegen nur in verschwindend geringen Mengen detektiert werden und scheinen bei der pankreatischen Neuritis nur einen untergeordneten Stellenwert einzunehmen. Wichtig ist die Entdeckung, dass es bei Patienten mit abdominalen Schmerzen lediglich zu einer Erhöhung der relativen Mastzellenanzahl kommt, wohingegen die Menge der anderen Subtypen konstant bleibt oder sich sogar verringert. Dabei dominiert der Anteil an Mastzellen vom MC_{TC}-Typ, wobei der Anteil der Chymase innerhalb der Mastzellen bei Patienten mit schmerzhafter Grunderkrankung ebenfalls erhöht ist.

Ähnlich wie bei der neuralen Entzündungszellinfiltration bei der CP bzw. beim PCa zeigen sich auch in anderen Erkrankungen des gastrointestinalen Trakts, wie etwa bei den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, dem Reizdarmsyndrom oder bei Entzündungen des Wurmfortsatzes, ähnliche neuropathische Veränderungen (Barbara, Stanghellini et al. 2004, Buhner and Schemann 2012). Auffallend

ist, dass es in diesen Fällen ebenfalls zu einer Anhäufung von neuronalen Entzündungszellinfiltraten kommt und dass diese auch mit einer organischen Dysfunktion und Schmerzen vergesellschaftet sind. In diesen genannten Erkrankungen fehlen mögliche Kausalansätze gänzlich.

Die genauen Mechanismen der neuropathischen Schmerzentstehung im Pankreas sind bis heute noch nicht vollständig verstanden (Drewes, Krarup et al. 2008, Demir, Tieftrunk et al. 2011). Studien, die die Sensibilität von Nozizeptoren sowie die Veränderung von Nerven und Nervendichte im Pankreasgewebe untersuchten, konnten eindeutig eine neuropathische Schmerzkomponente in der CP und im PCa nachweisen (Ceyhan, Michalski et al. 2008, Demir, Tieftrunk et al. 2011). Darüber hinaus konnten Drewes et al. nachweisen, dass zusätzlich zu den peripheren neuropathischen Schmerz-Komponenten vor allem auch in der CP viszero-sensorische Veränderungen des zentralen Nervensystems zu beobachten sind (Drewes, Krarup et al. 2008). Somit scheint der pankreatische Schmerz eine chronische periphere und zentrale neuropathische Komponente zu beherbergen.

Eine Frage, die sich aus den erfassten Ergebnissen stellt, ist, inwiefern sich die Mastzellanzahl und –aktivität auf Veränderungen der Schmerzwahrnehmung sowie der Nervendichte und -struktur auswirkt und inwiefern dies zu einer zentralen Hypersensibilität führen kann. Klassischerweise spielen Mastzellen eine herausragende Rolle bei immunologischen Geschehen. Insbesondere bei der allergischen Typ-I-Reaktion und bei der anaphylaktischen Immunreaktion sorgen sie durch die Degranulation und die konsekutive Ausschüttung ihrer Mediatoren, wie Histamin, Serotonin, Zytokinen und Prostaglandine, für die typischen Symptome (Bauer and Razin 2000). Neben dieser klassischen Funktion scheinen Mastzellen bei einer Vielzahl von Erkrankungen eine Rolle bei der Empfindung und Entstehung von viszeralem Schmerzen zu spielen. So wurden bereits schmerzhafte Organdysfunktionen beschrieben, bei welchen sich Mastzellen an Nervenfasern anordneten und unmittelbar mit dem Schweregrad der Schmerzen korrelierten (Bauer and Razin 2000, Barbara, Stanghellini et al. 2004). Typische Krankheitsbilder, welche Gegenstand intensiver klinischer und laborexperimenteller Forschung bezüglich organischer Dysfunktionen, Schmerzen und Mastzellinteraktionen und Mastzellbeteiligungen sind, sind beispielsweise Colitis ulcerosa, interstitielle Zystitis und Migräne (Bauer and Razin 2000, Klooker, Braak et al. 2010, Buhner and Schemann 2012, van Diest, Stanisor et al. 2012). Eine mögliche Beteiligung von

Mastzellen an der Schmerzentstehung und -empfindung ist neben der Anreicherung von Mastzellen um Nerven schon wegen der zum Teil engen Interaktion von Mastzellen und Nervenenden wahrscheinlich (Bauer and Razin 2000). Neben der engen Nachbarschaft zu Nervenenden können Mastzellen auch in nahegelegenen Nervenfasern, welche NGF, Calcitonin-Gen-Related-Peptide (CGRP) oder Substanz P enthalten, vorgefunden werden (Buhner and Schemann 2012). Entsprechende Transmitter können an Rezeptoren binden, welche sich auf der Mastzellenoberfläche befinden und deren Degranulation bewirken (Shanahan, Denburg et al. 1985, Krumins and Broomfield 1993, Kulka, Sheen et al. 2008). Eine Degranulation der Mastzellen wiederum zieht durch eine Ausschüttung von Mastzellenmediatoren wie Histamin, Serotonin, NGF oder Proteasen wie Tryptase oder Chymase eine receptorspezifische Sensibilisierung und Aktivierung der peripheren Neuronen mit konsekutiver Schmerzentstehung und neuraler Dysfunktion nach sich (Shanahan, Denburg et al. 1985, Krumins and Broomfield 1993, Kulka, Sheen et al. 2008, Levy, Kainz et al. 2012). Klooker et al. konnten 2010 zeigen, dass sich unter der Gabe von Ketotifen Symptome und Schmerzen bei Patienten mit Reizmagensyndrom verbesserten (Klooker, Braak et al. 2010). Ketotifen selbst wirkt in erste Linie mastzellstabilisierend und verhindert deren Degranulation, wodurch die Ausschüttung von Nerven sensibilisierenden Mastzellenmediatoren, wie etwa Histamin, Serotonin und Tryptase, verhindert wird. Basierend auf den Ergebnissen dieser Dissertation könnte – wie bei Patienten mit Reizmagensyndrom – die Gabe von Ketotifen dazu dienen, die Schmerzsymptomatik der Patienten mit CP oder PCa zu lindern, so dass es zu einer besseren und adäquateren Einstellung der Schmerzen durch Analgetika kommen kann.

Für die in der CP und im PCa vorkommende Neuroplastizität ist neben der Zunahme von Nerven Durchmesser und Nervenanzahl auch eine Zunahme von neurotrophen Substanzen charakteristisch, deren Expression mit der Schmerzcharakteristik in Zusammenhang steht. Hierzu zählen vor allem NGF, Artemin und Neurturin sowie deren Rezeptoren auf intrapancreatischen Nerven (Ceyhan, Demir et al. 2010, Ceyhan, Schafer et al. 2010). Welchen Stellenwert diese Moleküle in der Entstehung und Wahrnehmung von Schmerzen haben, zeigen hierbei u.a. die Experimente von Zhu et al. Dabei konnte in einem Rattenmodell gezeigt werden, dass durch die systemische Gabe von NGF-neutralisierenden Antikörpern die Erregbarkeit von Nozizeptoren im Pankreas abnimmt (Zhu, Colak et al. 2011). Welchen Stellenwert NGF genau bei der Pathogenese von neuropathischen Schmerzen bei CP und PCa einnimmt,

bleibt Gegenstand intensiver Forschung. Neben der Fähigkeit, sich an TrkA Rezeptoren von sympathischen und sensorischen Nerven zu binden und dadurch an der Schmerzempfindung beteiligt zu sein (McMahon, Bennett et al. 1995, McMahon 1996), besitzt NGF darüber hinaus eine zytokinähnliche Funktion. Diese ermöglicht NGF, Einfluss auf die Funktion und Rekrutierung von Entzündungszellen zu nehmen. Neuere Studien konnten zeigen, dass es in Immunzellen zu einer z.T. dynamischen Regulation des NGF-Rezeptors TrkA auf der Immunzellenoberfläche kommt (Aloe, Tuveri et al. 1992, di Mola, Friess et al. 2000, Ralainirina, Brons et al. 2010, Raychaudhuri, Raychaudhuri et al. 2011). Dies bestätigt die Beobachtungen von Aloe et al. aus dem Jahr 1977. In einem Versuch, in welchem NGF in Gewebe injiziert wurde, konnte danach deutlich mehr Mastzellen gefunden werden als in Geweben ohne NGF-Injektion (Aloe and Levi-Montalcini 1977). Hervorzuheben in diesem Zusammenhang sind die Studien von di Mola et al. In Geweben von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen konnte gezeigt werden, dass es neben Nerven auch in Mastzellen zu einer Expression von NGF mit simultaner TrkA-Rezeptoren Synthese kommt (di Mola, Friess et al. 2000). Zwar kommt es unter NGF-Stimulation nicht direkt zu einer Degranulation von Mastzellen (Kulka, Sheen et al. 2008), dennoch konnten Stempelj et al. zeigen, dass Mastzellen in Anwesenheit von NGF sensibilisiert werden und eher zu einer Histamin-Freisetzung neigen als nicht stimulierte Mastzellen (Stempelj and Ferjan 2005). Eine NGF-Blockade könnte die Zusammensetzung der pankreatischen Neuritis beispielsweise durch eine Reduktion des Mastzellenanteils beeinflussen und somit zu einer möglichen Abnahme der Schmerzen beitragen. Diverse Studien konnten bereits zeigen, dass NGF nicht nur an der Migration von Entzündungszellen beteiligt ist, sondern dass auch Entzündungszellen wie beispielsweise Lymphozyten (Aloe, Tuveri et al. 1992), Makrophagen (Brown, Perry et al. 1991) und Mastzellen (Leon, Buriani et al. 1994) produziert und sezerniert wird. Dies sind auch die Zellen, die – wie diese Dissertation erörtert – bei der Identifizierung der Entzündungszellen der pankreatischen Neuritis einen maßgeblichen Anteil bilden und auch an der Schmerzentstehung und -empfindung beteiligt sind. Welchen Einfluss NGF auf Schmerzen hat, belegt die Auswirkung einer Blockade von NGF in Ratten mit CP: Ratten mit CP, denen ein NGF neutralisierender Antikörper gespritzt wurde, zeigten eine verminderte Reaktion auf Schmerzreize als eine Vergleichskohorte ohne neutralisierende Antikörper (Zhu, Colak et al. 2011). Somit könnten NGF

blockierende Medikamente einen möglichen Effekt auf die Entstehung und Wahrnehmung von Schmerzen bei der CP und PCa haben und bei der Behandlung mit Analgetika helfen, indem es die Wirkung von aus perineuralen zytotoxischen T-Lymphozyten, Makrophagen und Mastzellen sezerniertem NGF abschwächt.

Neben NGF kommen CX3CL1 sowie dessen Rezeptor CXCR1 gehäuft im Gewebe von Patienten mit CP vor (Ceyhan, Deucker, et al., 2009). Dabei wirkt CX3CL1 durch seinen Rezeptor auch auf die an der pankreatischen Neuritis beteiligten zytotoxischen T-Lymphozyten sowie auf die Makrophagen ein und verändert deren Funktion (Bazan, Bacon et al. 1997, Umehara, Bloom et al. 2004). Darüber hinaus konnten mehrere Studien zeigen, dass CX3CL1 nicht nur bei der Rekrutierung und der Extravasation von zytotoxischen T-Lymphozyten und Makrophagen in entzündliches Gewebe beteiligt ist (Deiva, Geeraerts et al. 2004, Verge, Milligan et al. 2004), sondern dass durch glatte Muskelzellen hergestelltes CX3CL1 auch die Rekrutierung von Mastzellen bei Asthmapatienten fördert (El-Shazly, Berger et al. 2006). Dass sezerniertes CX3CL1 in der CP und im PCa bei der Rekrutierung von Mastzellen an der pankreatischen Neuritis beteiligt ist und somit bei der Schmerzentstehung eine wichtige Rolle spielt, erscheint durchaus möglich, bedarf aber zur Bestätigung noch intensiverer Erforschung. Eine Blockierung von CX3CR1 bzw. eine Neutralisierung von CX3CL1 könnte die Zusammensetzung der perineuralen Entzündungszellinfiltrate verändern und bei der Schmerzbehandlung behilflich sein.

Neben NGF, Armin und Neurturin sind bei Patienten mit CP und ausgeprägten abdominalen Schmerzen die Expression der Neuropeptide CGRP und von Substanz P deutlich erhöht und zeigen außerdem eine Korrelation mit der Intensität der Schmerzen (Ceyhan, Bergmann et al. 2007, Ceyhan, Schafer et al. 2010). Bemerkenswert ist dabei die Rolle, die CGRP und Substanz P bei der Rekrutierung und Modifikation der Entzündungszellenfunktionen einnehmen. So zeigen stimulierte Mastzellen eine erhöhte Expression von Substanz P-Rezeptoren NK-1 (Bischoff, Schwengberg et al. 2004, Kulka, Sheen et al. 2008). Shanahan et al. konnten bei Versuchen mit Mukosa-Mastzellen zeigen, dass es bei einer Stimulation von Mastzellen mit unphysiologisch hohen Dosen von Substanz P zu einer Freisetzung von Histamin kommt (Shanahan, Denburg et al. 1985, Krumins and Broomfield 1993). Noch bedeutender ist die dabei gemachte Entdeckung, dass es bei niedrigeren Dosen von Substanz P zu einer Freisetzung

von TNF α ohne gleichzeitige Freisetzung von Histamin oder anderen Mastzellmediatoren kommt (Ansel, Brown et al. 1993, Kulka, Sheen et al. 2008, Li, Guo et al. 2012, van Diest, Stanisor et al. 2012). Aber nicht nur die Sekretion der Mastzellen wird unter dem Einfluss von Substanz P verändert, es erfolgt ferner eine Hochregulation von Toll-like-2-Rezeptoren auf den Mastzellen und somit eine Veränderung deren Erregbarkeit und Funktion (Tancowny, Karpov et al. 2010, van Diest, Stanisor et al. 2012). Leider existieren bis heute sehr wenige Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen diesen Mediatoren und Mastzellen bei Patienten mit CP und neuropathischen Schmerzen, so dass sich zum aktuellen Zeitpunkt nur schwer das Ausmaß einer möglichen therapeutischen Option der pankreatischen Schmerzen durch die Blockade dieser Substanzen voraussagen lässt.

Weitere Rezeptoren, die eine Rolle bei der Schmerzentstehung und –wahrnehmung bei PCa und CP spielen, sind die Protease-Aktivierten-Rezeptoren Typ 1 (PAR-1) und Typ 2 (PAR-2) (Narita, Usui et al. 2005, Lam and Schmidt 2010, Zhang, Gao et al. 2011, Oliveira, Silva et al. 2013, Poole, Amadesi et al. 2013). Diesbezüglich konnten bereits etliche Studien eine Vielzahl von Mediatoren und Stimulatoren identifizieren, deren Überexpression die Entstehung und Förderung von Schmerzen im Pankreas bewirkt. Dabei sind ein Großteil der Schmerzmediatoren auch an einer bi-direktionalen Kommunikation zwischen nozizeptiven Nerven und Mastzellen beteiligt (Bauer and Razin 2000). Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation bezüglich der Expression von PAR-1 und PAR-2 deuten darauf hin, dass es - verglichen mit der Expression in normalem Gewebe - weder zu einer Überexpression dieser Rezeptoren in der CP noch im PCa kommt. Das Expressionsniveau von PAR-1 und PAR-2 scheint somit eine nur untergeordnete Rolle in der Schmerzwahrnehmung und –entstehung zu haben, da es zu keiner Expressionsänderung innerhalb der Patientenkohorten mit und ohne Schmerzen kam. Jedoch lässt die Existenz der Rezeptoren in intrapancreatischen Nerven in Bezug auf die Schmerzsymptomatik der beiden Erkrankungen ein Zusammenspiel zwischen den Rezeptoren und von Mastzellen sekretierten Mediatoren vermuten. Einen möglichen „Kandidaten“ dafür stellt die Tryptase dar. So zeigten frühere Veröffentlichungen bereits, dass Tryptase in der Lage ist, durch die Aktivierung von PAR-2 Einfluss auf Neurone zu nehmen (Steinhoff, Vergnolle et al. 2000). PAR-2 selbst wird auf SGs exprimiert, welche neben anderen Mediatoren auch CGRP und Substanz P beinhalten. Substanz P und CGRP nehmen wiederum Einfluss bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der Entzündung und beeinflussen gleichzeitig die

Funktion von Mastzellen (Steinhoff, Vergnolle et al. 2000). Humane Mastzelltryptase besitzt noch eine weitere Fähigkeit, die bei der Entstehung von neuropathischen Schmerzen bei PCa und CP beteiligt sein könnte. So konnten Spinnler et al. (Spinnler, Frohlich et al. 2011) nachweisen, dass es unter dem Einfluss von humaner Tryptase zu einer Spaltung des NGF-Vorläufermoleküls pro-NGF und folglich zu einem Anstieg von NGF kommt. Inwiefern Tryptase auch bei der CP und im PCa zu einem signifikanten Anstieg von NGF führt, bedarf noch weiterer Forschung.

Die neurale Invasion von Karzinomzellen in intrapankreatische Nerven zeigt sich zunehmend als prognostischer Faktor, der sich nicht nur in der Gesamtüberlebenszeit widerspiegelt, sondern auch in der Rezidivwahrscheinlichkeit und der Disease-Free-Survival-Zeit (Chatterjee, Katz et al. 2012, Zhang, Frampton et al. 2012). Einen bekannten und bereits erforschten Risikofaktor, welcher die Invasion von Tumorzellen in Nerven fördert, stellt dabei die Tumordinfiltration von Mastzellen dar (Strouch, Cheon et al. 2010, Chang, Ma et al. 2011, Evans and Costello 2012). Darüber hinaus steigern Mastzellen bzw. von Mastzellen sezernierte Mediatoren nicht nur die neurale Migrations-Fähigkeit von Tumorzellen, sondern sorgen auch dafür, dass die Proliferations- und die Migrationsrate von Karzinomzellen gesteigert wird (Strouch, Cheon et al. 2010). Ein konkreter Anhaltspunkt für einen Zusammenhang zwischen dem Grad der neuralen Invasion und dem Vorhandensein von Mastzellen im PCa konnte durch diese Arbeit jedoch nicht belegt werden. Daher liegt anhand der durch diese Studie gelieferten Daten die Vermutung nahe, dass die Folge der Mastzellpräsenz in der pankreatischen Neuritis im PCa mehr mit dem Auftreten von Schmerzen in Zusammenhang gebracht werden kann, als mit der Fähigkeit von Tumorzellen, in Nervenfasern zu invadieren.

Welchen enormen Stellenwert Immunzellen hinsichtlich der Prognose des Karzinoms einnehmen, ist ein gut erforschtes Thema. So konnten bislang mehrere Studien zeigen, dass die vermehrte Infiltration des Tumors durch Entzündungszellen insbesondere verbunden mit dem gehäuften Auftreten von Mastzellen eine schlechtere Prognose bedingen (Strouch, Cheon et al. 2010, Cai, Yang et al. 2011, Chang, Ma et al. 2011). Chang et al zeigten, dass es bei Mäusen mit PCa, in denen Mastzellen selektiv ablädiert wurden, zu einer Verlängerung der Lebenszeit kommt (Chang, Ma et al. 2011). Vergleichbares zeigt die Studie von Esposito et al. aus dem Jahr 2004: Hierbei korrelierten in pathologischen Präparaten

von Patienten mit PCa das Ausmaß der Mastzellinfiltration mit der Anzahl der auftretenden Lymphknotenmetastasen (Esposito, Friess et al. 2001).

Eine andere Immunzellenart, welche bei pankreatischer Neuritis in großer Anzahl vertreten ist und bei der neuralen Invasion wichtige Rolle spielt, sind CD68+ Makrophagen. Cavel et al. konnten nachweisen, dass durch Makrophagen sezerniertes GDNF und durch die Aktivierung von RET-Tyrosine-Kinase-Rezeptoren die neurale Invasion von Karzinomzellen gesteigert werden kann (Cavel, Shomron et al. 2012). Für die Einschätzung, inwieweit eine Modifikation der Makrophagen die Prognose von Patienten ändert, bedarf es jedoch noch weiterer Forschung.

Leider befasst sich bislang nur eine einzige Studie mit der Rolle von Mastzellen und dem Auftreten von abdominalen Schmerzen im Pankreas. Es konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit CP und abdominalen Schmerzen die Anzahl von Mastzellen im gesamten Pankreas erhöht ist (Hoogerwerf, Gondesen et al. 2005). Darüber hinaus zeigten mastzellensupprimierte Mäuse mit CP eine herabgesetzte taktile Empfindlichkeit. Jedoch befasste sich die vorliegende Studie mit der Quantifizierung von Mastzellen im gesamten Pankreas und nicht mit der Untersuchung von an Neuritis beteiligten Mastzellen, welche unmittelbar an der Kommunikation zwischen Nerven und Mastzellen teilnehmen (Hoogerwerf, Gondesen et al. 2005). Darüber hinaus existiert bislang noch keine weitere Studie, die sich mit dem Auftreten von pankreatischen, neuropathischen Schmerzen und dem Auftreten von Mastzellen im PCa von Menschen befassen.

Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Dissertationsarbeit zum ersten Mal die einzelnen Immunzellsubtypen der neuralen Entzündungszellinfiltrate im Rahmen der pankreatischen Neuritis in der CP und im PCa im Detail differenziert und charakterisiert werden. Dabei konnte festgestellt werden, dass vorwiegend Makrophagen, CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten und Mastzellen an der Neuritis beteiligt sind, wohingegen andere Immunzellen nur eine untergeordnete Rolle spielen. In Hinblick auf das Auftreten von neuropathischen, pankreatischen Schmerzen scheint allein die Mastzellpopulation als einzige Immunzellpopulation einen Einfluss in der Schmerzsensation zu spielen.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass ähnlich wie bei anderen chronischen Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes, wie etwa dem Reizmagensyndrom und der Colitis Ulcerosa, die Mastzellen den dominanten Anteil der Immunzellen bilden, die unmittelbar an der Entstehung von Schmerzen beteiligt sind und für die Entstehung der nozizeptiven Überempfindlichkeit von Neuronen im Pankreas verantwortlich sind. Insbesondere die Erforschung der Mediatoren und der Modulation von Mastzellen sowie die Stabilisierung von Mastzellen durch Medikamente und die Auswirkungen auf pankreatische, neuropathische Schmerzen könnten in Zukunft die supportive Behandlung des PCa und der CP maßgeblich verändern und vielleicht die Lebensqualität von über Schmerzen klagenden Patienten verbessern.

6. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

In Zusammenhang mit der vorliegenden medizinischen Dissertation wurden erstmals die einzelnen Immunzellsubtypen der pankreatischen Neuritis im PCa und in der CP charakterisiert und bestimmt. Die perineuralen Entzündungszellinfiltrate bestehen zum größten Teil aus CD68+ Makrophagen, CD8+, zytotoxischen T-Lymphozyten und Mastzellen, wohingegen andere Zelltypen nur in verschwindend geringen Mengen beobachtet wurden und bei der pankreatischen Neuritis eine untergeordnete Rolle zu spielen scheinen.

In Geweben von Patienten mit CP und PCa mit abdominalen Schmerzen konnte ein isolierter und spezifischer Anstieg von Mastzellen beobachtet werden. Die Zahl der Immunzelltypen war abgesehen von CD8+ T-Lymphozyten, welche bei schmerzlosen Patienten mit CP zahlenmäßig geringer waren, weitgehend konstant.

Eine Unterteilung der einzelnen Mastzellensubtypen erbrachte das Ergebnis, dass es sich bei der CP und beim PCa vorwiegend um Chymase/Tryptase positive Mastzellen handelt. Im Gegensatz zu normalem Pankreasgewebe sind bei beiden Erkrankungen neben Chymase/Tryptase positiven Mastzellen auch ausschließlich Tryptase positive Mastzellen zu finden. Dabei kommt es bei Patienten mit CP und Schmerzen zu einem signifikanten Anstieg der Chymase/Tryptase-positiven Mastzellen im Vergleich zu CP-Patienten ohne Schmerzen .

Eine Untersuchung der Protease-Aktivierten-Rezeptoren Typ 1 (PAR-1) und Typ 2 (PAR-2), welche durch die von den Mastzellen sezernierten Proteasen aktiviert werden können, brachte das Ergebnis, dass das Expressionsniveau bei beiden Erkrankungen im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe nicht erhöht ist und somit für diese Fragestellung keine Relevanz aufweist. Ebenso konnte kein Zusammenhang zwischen dem Grad der neuralen Invasion und der Anzahl an perineuralen Mastzellen beobachtet werden.

Schlussfolgernd könnten Auswirkungen von mastzellmodulierenden oder -stabilisierenden Medikamenten, wie beispielsweise Ketotifen, bei der komplizierten und langwierigen Behandlung von pankreatischen, neuropathischen Schmerzen einen zusätzlichen Vorteil für die Patienten bringen und die

Schmerzbehandlung deutlich vereinfachen. Diesbezüglich sind noch weitere Untersuchungen und Experimente notwendig, um den Erfolg und den Nutzen dieser Medikamente bei der Behandlung von neuropathischen Schmerzen bei der CP und beim PCa nachzuweisen.

7. Quellenverzeichnis

- Agarwal, B., E. Abu-Hamda, K. L. Molke, A. M. Correa and L. Ho (2004). "Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration and multidetector spiral CT in the diagnosis of pancreatic cancer." Am J Gastroenterol **99**(5): 844-850.
- Alexakis, N., C. Halloran, M. Raraty, P. Ghaneh, R. Sutton and J. P. Neoptolemos (2004). "Current standards of surgery for pancreatic cancer." Br J Surg **91**(11): 1410-1427.
- Aloe, L. and R. Levi-Montalcini (1977). "Mast cells increase in tissues of neonatal rats injected with the nerve growth factor." Brain Res **133**(2): 358-366.
- Aloe, L., M. A. Tuveri and R. Levi-Montalcini (1992). "Studies on carrageenan-induced arthritis in adult rats: presence of nerve growth factor and role of sympathetic innervation." Rheumatol Int **12**(5): 213-216.
- Ansel, J. C., J. R. Brown, D. G. Payan and M. A. Brown (1993). "Substance P selectively activates TNF-alpha gene expression in murine mast cells." J Immunol **150**(10): 4478-4485.
- Bai, H. X., M. Giefer, M. Patel, A. I. Orabi and S. Z. Husain (2012). "The association of primary hyperparathyroidism with pancreatitis." J Clin Gastroenterol **46**(8): 656-661.
- Barbara, G., V. Stanghellini, R. De Giorgio, C. Cremon, G. S. Cottrell, D. Santini, G. Pasquinelli, A. M. Morselli-Labate, E. F. Grady, N. W. Bunnett, S. M. Collins and R. Corinaldesi (2004). "Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome." Gastroenterology **126**(3): 693-702.
- Bauer, O. and E. Razin (2000). "Mast Cell-Nerve Interactions." News Physiol Sci **15**: 213-218.
- Bazan, J. F., K. B. Bacon, G. Hardiman, W. Wang, K. Soo, D. Rossi, D. R. Greaves, A. Zlotnik and T. J. Schall (1997). "A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif." Nature **385**(6617): 640-644.
- Berrington de Gonzalez, A., S. Sweetland and E. Spencer (2003). "A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer." Br J Cancer **89**(3): 519-523.
- Bischoff, S. C., S. Schwengberg, A. Lorentz, M. P. Manns, H. Bektas, H. Sann, F. Levi-Schaffer, F. Shanahan and M. Schemann (2004). "Substance P and other neuropeptides do not induce mediator release in isolated human intestinal mast cells." Neurogastroenterol Motil **16**(2): 185-193.
- Bockman, D. E., M. Buchler and H. G. Beger (1994). "Interaction of pancreatic ductal carcinoma with nerves leads to nerve damage." Gastroenterology **107**(1): 219-230.
- Bockman, D. E., M. Buchler, P. Malfertheiner and H. G. Beger (1988). "Analysis of nerves in chronic pancreatitis." Gastroenterology **94**(6): 1459-1469.
- Braganza, J. M., S. H. Lee, R. F. McCloy and M. J. McMahon (2011). "Chronic pancreatitis." Lancet **377**(9772): 1184-1197.
- Brown, D. L., C. K. Bulley and E. L. Quiel (1987). "Neurolytic celiac plexus block for pancreatic cancer pain." Anesth Analg **66**(9): 869-873.
- Brown, M. C., V. H. Perry, E. R. Lunn, S. Gordon and R. Heumann (1991). "Macrophage dependence of peripheral sensory nerve regeneration: possible involvement of nerve growth factor." Neuron **6**(3): 359-370.
- Buhner, S. and M. Schemann (2012). "Mast cell-nerve axis with a focus on the human gut." Biochim Biophys Acta **1822**(1): 85-92.
- Burris, H. A., 3rd, M. J. Moore, J. Andersen, M. R. Green, M. L. Rothenberg, M. R. Modiano, M. C. Cripps, R. K. Portenoy, A. M. Storniolo, P. Tarassoff, R. Nelson, F. A. Dorr, C. D. Stephens and D. D. Von Hoff (1997). "Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial." J Clin Oncol **15**(6): 2403-2413.

- Cai, S. W., S. Z. Yang, J. Gao, K. Pan, J. Y. Chen, Y. L. Wang, L. X. Wei and J. H. Dong (2011). "Prognostic significance of mast cell count following curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma." Surgery **149**(4): 576-584.
- Carroll, S. L., M. L. Miller, P. W. Frohnert, S. S. Kim and J. A. Corbett (1997). "Expression of neuregulins and their putative receptors, ErbB2 and ErbB3, is induced during Wallerian degeneration." J Neurosci **17**(5): 1642-1659.
- Catalano, C., A. Laghi, F. Fraioli, F. Pediconi, A. Napoli, M. Danti, I. Reitano and R. Passariello (2003). "Pancreatic carcinoma: the role of high-resolution multislice spiral CT in the diagnosis and assessment of resectability." Eur Radiol **13**(1): 149-156.
- Cavel, O., O. Shomron, A. Shabtay, J. Vital, L. Trejo-Leider, N. Weizman, Y. Krelin, Y. Fong, R. J. Wong, M. Amit and Z. Gil (2012). "Endoneurial macrophages induce perineural invasion of pancreatic cancer cells by secretion of GDNF and activation of RET tyrosine kinase receptor." Cancer Res **72**(22): 5733-5743.
- Ceyhan, G. O., F. Bergmann, M. Kadihasanoglu, B. Altintas, I. E. Demir, U. Hinz, M. W. Muller, T. Giese, M. W. Buchler, N. A. Giese and H. Friess (2009). "Pancreatic neuropathy and neuropathic pain--a comprehensive pathomorphological study of 546 cases." Gastroenterology **136**(1): 177-186 e171.
- Ceyhan, G. O., F. Bergmann, M. Kadihasanoglu, M. Erkan, W. Park, U. Hinz, T. Giese, M. W. Muller, M. W. Buchler, N. A. Giese and H. Friess (2007). "The neurotrophic factor artemin influences the extent of neural damage and growth in chronic pancreatitis." Gut **56**(4): 534-544.
- Ceyhan, G. O., I. E. Demir, M. Maak and H. Friess (2010). "Fate of nerves in chronic pancreatitis: Neural remodeling and pancreatic neuropathy." Best Pract Res Clin Gastroenterol **24**(3): 311-322.
- Ceyhan, G. O., S. Deucker, I. E. Demir, M. Erkan, M. Schmelz, F. Bergmann, M. W. Muller, T. Giese, M. W. Buchler, N. A. Giese and H. Friess (2009). "Neural fractalkine expression is closely linked to pain and pancreatic neuritis in human chronic pancreatitis." Lab Invest **89**(3): 347-361.
- Ceyhan, G. O., N. A. Giese, M. Erkan, A. G. Kerscher, M. N. Wente, T. Giese, M. W. Buchler and H. Friess (2006). "The neurotrophic factor artemin promotes pancreatic cancer invasion." Ann Surg **244**(2): 274-281.
- Ceyhan, G. O., C. W. Michalski, I. E. Demir, M. W. Muller and H. Friess (2008). "Pancreatic pain." Best Pract Res Clin Gastroenterol **22**(1): 31-44.
- Ceyhan, G. O., K. H. Schafer, A. G. Kerscher, U. Rauch, I. E. Demir, M. Kadihasanoglu, C. Bohm, M. W. Muller, M. W. Buchler, N. A. Giese, M. Erkan and H. Friess (2010). "Nerve growth factor and artemin are paracrine mediators of pancreatic neuropathy in pancreatic adenocarcinoma." Ann Surg **251**(5): 923-931.
- Chang, D. Z., Y. Ma, B. Ji, H. Wang, D. Deng, Y. Liu, J. L. Abbruzzese, Y. J. Liu, C. D. Logsdon and P. Hwu (2011). "Mast cells in tumor microenvironment promotes the in vivo growth of pancreatic ductal adenocarcinoma." Clin Cancer Res **17**(22): 7015-7023.
- Chari, S. T., C. L. Leibson, K. G. Rabe, J. Ransom, M. de Andrade and G. M. Petersen (2005). "Probability of pancreatic cancer following diabetes: a population-based study." Gastroenterology **129**(2): 504-511.
- Chatterjee, D., M. H. Katz, A. Rashid, H. Wang, A. C. Iuga, G. R. Varadhachary, R. A. Wolff, J. E. Lee, P. W. Pisters, C. H. Crane, H. F. Gomez, J. L. Abbruzzese, J. B. Fleming and H. Wang (2012). "Perineural and intraneural invasion in posttherapy pancreaticoduodenectomy specimens predicts poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma." Am J Surg Pathol **36**(3): 409-417.
- Cohn, J. A. (2005). "Reduced CFTR function and the pathobiology of idiopathic pancreatitis." J Clin Gastroenterol **39**(4 Suppl 2): S70-77.
- Conroy, T., F. Desseigne, M. Ychou, O. Bouche, R. Guimbaud, Y. Becouarn, A. Adenis, J. L. Raoul, S. Gourgou-Bourgade, C. de la Fouchardiere, J. Bennouna, J. B. Bachet, F. Khemissa-Akouz,

- D. Pere-Verge, C. Delbaldo, E. Assenat, B. Chauffert, P. Michel, C. Montoto-Grillot, M. Ducreux, U. Groupe Tumeurs Digestives of and P. Intergroup (2011). "FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer." *N Engl J Med* **364**(19): 1817-1825.
- Coughlin, S. S., E. E. Calle, A. V. Patel and M. J. Thun (2000). "Predictors of pancreatic cancer mortality among a large cohort of United States adults." *Cancer Causes Control* **11**(10): 915-923.
- Dabrowski, A., C. Boguslawicz, M. Dabrowska, I. Tribillo and A. Gabryelewicz (2000). "Reactive oxygen species activate mitogen-activated protein kinases in pancreatic acinar cells." *Pancreas* **21**(4): 376-384.
- Deiva, K., T. Geeraerts, H. Salim, P. Leclerc, C. Hery, B. Hugel, J. M. Freyssinet and M. Tardieu (2004). "Fractalkine reduces N-methyl-d-aspartate-induced calcium flux and apoptosis in human neurons through extracellular signal-regulated kinase activation." *Eur J Neurosci* **20**(12): 3222-3232.
- Demir, I. E., G. O. Ceyhan, F. Liebl, J. G. D'Haese, M. Maak and H. Friess (2010). "Neural Invasion in Pancreatic Cancer: The Past, Present and Future." *Cancers* **2**(3): 1513-1527.
- Demir, I. E., H. Friess and G. O. Ceyhan (2012). "Nerve-cancer interactions in the stromal biology of pancreatic cancer." *Front Physiol* **3**: 97.
- Demir, I. E., E. Tieftrunk, M. Maak, H. Friess and G. O. Ceyhan (2011). "Pain mechanisms in chronic pancreatitis: of a master and his fire." *Langenbecks Arch Surg* **396**(2): 151-160.
- Dewitt, J., B. M. Devereaux, G. A. Lehman, S. Sherman and T. F. Imperiale (2006). "Comparison of endoscopic ultrasound and computed tomography for the preoperative evaluation of pancreatic cancer: a systematic review." *Clin Gastroenterol Hepatol* **4**(6): 717-725; quiz 664.
- di Mola, F. F., H. Friess, Z. W. Zhu, A. Koliopoulos, T. Bley, P. Di Sebastiano, P. Innocenti, A. Zimmermann and M. W. Buchler (2000). "Nerve growth factor and Trk high affinity receptor (TrkA) gene expression in inflammatory bowel disease." *Gut* **46**(5): 670-679.
- Di Sebastiano, P., T. Fink, E. Weihe, H. Friess, P. Innocenti, H. G. Beger and M. W. Buchler (1997). "Immune cell infiltration and growth-associated protein 43 expression correlate with pain in chronic pancreatitis." *Gastroenterology* **112**(5): 1648-1655.
- Di Stasi, M., R. Lencioni, L. Solmi, F. Magnolfi, E. Caturelli, I. De Sio, A. Salmi and L. Buscarini (1998). "Ultrasound-guided fine needle biopsy of pancreatic masses: results of a multicenter study." *Am J Gastroenterol* **93**(8): 1329-1333.
- Drewes, A. M., A. L. Krarup, S. Detlefsen, M. L. Malmstrom, G. Dimcevski and P. Funch-Jensen (2008). "Pain in chronic pancreatitis: the role of neuropathic pain mechanisms." *Gut* **57**(11): 1616-1627.
- Dufour, M. C. and M. D. Adamson (2003). "The epidemiology of alcohol-induced pancreatitis." *Pancreas* **27**(4): 286-290.
- El-Shazly, A., P. Berger, P. O. Girodet, O. Ousova, M. Fayon, J. M. Vernejoux, R. Marthan and J. M. Tunon-de-Lara (2006). "Fractalkine produced by airway smooth muscle cells contributes to mast cell recruitment in asthma." *J Immunol* **176**(3): 1860-1868.
- Emmrich, J., I. Weber, M. Nausch, G. Sparmann, K. Koch, M. Seyfarth, M. Lohr and S. Liebe (1998). "Immunohistochemical characterization of the pancreatic cellular infiltrate in normal pancreas, chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma." *Digestion* **59**(3): 192-198.
- Esposito, I., H. Friess, A. Kappeler, S. Shrikhande, J. Kleeff, H. Ramesh, A. Zimmermann and M. W. Buchler (2001). "Mast cell distribution and activation in chronic pancreatitis." *Human Pathology* **32**(11): 1174-1183.
- Evans, A. and E. Costello (2012). "The role of inflammatory cells in fostering pancreatic cancer cell growth and invasion." *Front Physiol* **3**: 270.
- Everhart, J. and D. Wright (1995). "Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis." *JAMA* **273**(20): 1605-1609.
- Farnell, M. B., R. K. Pearson, M. G. Sarr, E. P. DiMagno, L. J. Burgart, T. R. Dahl, N. Foster, D. J. Sargent and G. Pancreas Cancer Working (2005). "A prospective randomized trial comparing

- standard pancreatoduodenectomy with pancreatoduodenectomy with extended lymphadenectomy in resectable pancreatic head adenocarcinoma." *Surgery* **138**(4): 618-628; discussion 628-630.
- Fink, T., P. Di Sebastiano, M. Buchler, H. G. Beger and E. Weihe (1994). "Growth-associated protein-43 and protein gene-product 9.5 innervation in human pancreas: changes in chronic pancreatitis." *Neuroscience* **63**(1): 249-266.
- Friess, H., P. O. Berberat, M. Wirtz and M. W. Buchler (2002). "Surgical treatment and long-term follow-up in chronic pancreatitis." *Eur J Gastroenterol Hepatol* **14**(9): 971-977.
- Friess, H., S. Shrikhande, M. Shrikhande, M. Martignoni, C. Kulli, A. Zimmermann, A. Kappeler, H. Ramesh and M. Buchler (2002). "Neural alterations in surgical stage chronic pancreatitis are independent of the underlying aetiology." *Gut* **50**(5): 682-686.
- Fuchs, C. S., G. A. Colditz, M. J. Stampfer, E. L. Giovannucci, D. J. Hunter, E. B. Rimm, W. C. Willett and F. E. Speizer (1996). "A prospective study of cigarette smoking and the risk of pancreatic cancer." *Arch Intern Med* **156**(19): 2255-2260.
- Gaisano, H. Y. and F. S. Gorelick (2009). "New insights into the mechanisms of pancreatitis." *Gastroenterology* **136**(7): 2040-2044.
- Galli, S. J., N. Borregaard and T. A. Wynn (2011). "Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils." *Nat Immunol* **12**(11): 1035-1044.
- Gapstur, S. M., P. H. Gann, W. Lowe, K. Liu, L. Colangelo and A. Dyer (2000). "Abnormal glucose metabolism and pancreatic cancer mortality." *JAMA* **283**(19): 2552-2558.
- Ghaneh, P., E. Costello and J. P. Neoptolemos (2008). "Biology and management of pancreatic cancer." *Postgraduate Medical Journal* **84**(995): 478-497.
- Goda, S., T. Imai, O. Yoshie, O. Yoneda, H. Inoue, Y. Nagano, T. Okazaki, H. Imai, E. T. Bloom, N. Domae and H. Umehara (2000). "CX3C-chemokine, fractalkine-enhanced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells through integrin-dependent and -independent mechanisms." *J Immunol* **164**(8): 4313-4320.
- Goonetilleke, K. S. and A. K. Siriwardena (2007). "Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer." *Eur J Surg Oncol* **33**(3): 266-270.
- Gress, F., K. Gottlieb, S. Sherman and G. Lehman (2001). "Endoscopic ultrasonography-guided fine-needle aspiration biopsy of suspected pancreatic cancer." *Ann Intern Med* **134**(6): 459-464.
- Gupta, V. and P. P. Toskes (2005). "Diagnosis and management of chronic pancreatitis." *Postgrad Med J* **81**(958): 491-497.
- Hezel, A. F., A. C. Kimmelman, B. Z. Stanger, N. Bardeesy and R. A. Depinho (2006). "Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma." *Genes Dev* **20**(10): 1218-1249.
- Hoogerwerf, W. A., K. Gondesens, S. Y. Xiao, J. H. Winston, W. D. Willis and P. J. Pasricha (2005). "The role of mast cells in the pathogenesis of pain in chronic pancreatitis." *BMC Gastroenterol* **5**: 8.
- Howes, N., M. M. Lerch, W. Greenhalf, D. D. Stocken, I. Ellis, P. Simon, K. Truninger, R. Ammann, G. Cavallini, R. M. Charnley, G. Uomo, M. Delhaye, J. Spicak, B. Drumm, J. Jansen, R. Mountford, D. C. Whitcomb, J. P. Neoptolemos, P. European Registry of Hereditary and C. Pancreatic (2004). "Clinical and genetic characteristics of hereditary pancreatitis in Europe." *Clin Gastroenterol Hepatol* **2**(3): 252-261.
- Howes, N. and J. P. Neoptolemos (2002). "Risk of pancreatic ductal adenocarcinoma in chronic pancreatitis." *Gut* **51**(6): 765-766.
- Imai, T., K. Hieshima, C. Haskell, M. Baba, M. Nagira, M. Nishimura, M. Kakizaki, S. Takagi, H. Nomiyama, T. J. Schall and O. Yoshie (1997). "Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion." *Cell* **91**(4): 521-530.
- Jaffee, E. M., R. H. Hruban, M. Canto and S. E. Kern (2002). "Focus on pancreas cancer." *Cancer Cell* **2**(1): 25-28.

- Kahl, S., B. Glasbrenner, A. Leodolter, M. Pross, H. U. Schulz and P. Malfertheiner (2002). "EUS in the diagnosis of early chronic pancreatitis: a prospective follow-up study." Gastrointest Endosc **55**(4): 507-511.
- Keith, R. G., S. H. Keshavjee and N. R. Kerenyi (1985). "Neuropathology of chronic pancreatitis in humans." Can J Surg **28**(3): 207-211.
- Klooker, T. K., B. Braak, K. E. Koopman, O. Welting, M. M. Wouters, S. van der Heide, M. Schemann, S. C. Bischoff, R. M. van den Wijngaard and G. E. Boeckxstaens (2010). "The mast cell stabiliser ketotifen decreases visceral hypersensitivity and improves intestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome." Gut **59**(9): 1213-1221.
- Krumins, S. A. and C. A. Broomfield (1993). "C-terminal substance P fragments elicit histamine release from a murine mast cell line." Neuropeptides **24**(1): 5-10.
- Kulka, M., C. H. Sheen, B. P. Tancowny, L. C. Grammer and R. P. Schleimer (2008). "Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production." Immunology **123**(3): 398-410.
- Lam, D. K. and B. L. Schmidt (2010). "Serine proteases and protease-activated receptor 2-dependent allodynia: a novel cancer pain pathway." Pain **149**(2): 263-272.
- Leon, A., A. Buriani, R. Dal Toso, M. Fabris, S. Romanello, L. Aloe and R. Levi-Montalcini (1994). "Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(9): 3739-3743.
- Leung, P. S. and Y. C. Chan (2009). "Role of oxidative stress in pancreatic inflammation." Antioxid Redox Signal **11**(1): 135-165.
- Levy, D., V. Kainz, R. Burstein and A. M. Strassman (2012). "Mast cell degranulation distinctly activates trigemino-cervical and lumbosacral pain pathways and elicits widespread tactile pain hypersensitivity." Brain Behav Immun **26**(2): 311-317.
- Li, D., K. Xie, R. Wolff and J. L. Abbruzzese (2004). "Pancreatic cancer." The Lancet **363**(9414): 1049-1057.
- Li, W. W., T. Z. Guo, D. Y. Liang, Y. Sun, W. S. Kingery and J. D. Clark (2012). "Substance P signaling controls mast cell activation, degranulation, and nociceptive sensitization in a rat fracture model of complex regional pain syndrome." Anesthesiology **116**(4): 882-895.
- Lin, P. W. and Y. J. Lin (1999). "Prospective randomized comparison between pylorus-preserving and standard pancreaticoduodenectomy." Br J Surg **86**(5): 603-607.
- Loos, M., J. Kleeff, H. Friess and M. W. Buchler (2008). "Surgical treatment of pancreatic cancer." Ann N Y Acad Sci **1138**: 169-180.
- Maire, F., P. Hammel, P. Ponsot, A. Aubert, D. O'Toole, O. Hentic, P. Levy and P. Ruszniewski (2006). "Long-term outcome of biliary and duodenal stents in palliative treatment of patients with unresectable adenocarcinoma of the head of pancreas." Am J Gastroenterol **101**(4): 735-742.
- Malin, S. A., D. C. Molliver, H. R. Koerber, P. Cornuet, R. Frye, K. M. Albers and B. M. Davis (2006). "Glial cell line-derived neurotrophic factor family members sensitize nociceptors in vitro and produce thermal hyperalgesia in vivo." J Neurosci **26**(33): 8588-8599.
- Malka, D., P. Hammel, F. Maire, P. Rufat, I. Madeira, F. Pessione, P. Levy and P. Ruszniewski (2002). "Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis." Gut **51**(6): 849-852.
- McMahon, S. B. (1996). "NGF as a mediator of inflammatory pain." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **351**(1338): 431-440.
- McMahon, S. B., D. L. Bennett, J. V. Priestley and D. L. Shelton (1995). "The biological effects of endogenous nerve growth factor on adult sensory neurons revealed by a trkA-IgG fusion molecule." Nat Med **1**(8): 774-780.
- Michaud, D. S., E. Giovannucci, W. C. Willett, G. A. Colditz, M. J. Stampfer and C. S. Fuchs (2001). "Physical activity, obesity, height, and the risk of pancreatic cancer." JAMA **286**(8): 921-929.

- Minniti, S., C. Bruno, C. Biasiutti, D. Tonel, A. Falzone, M. Falconi and C. Procacci (2003). "Sonography versus helical CT in identification and staging of pancreatic ductal adenocarcinoma." J Clin Ultrasound **31**(4): 175-182.
- Morohoshi, T., G. Held and G. Kloppel (1983). "Exocrine pancreatic tumours and their histological classification. A study based on 167 autopsy and 97 surgical cases." Histopathology **7**(5): 645-661.
- Mullhaupt, B., K. Truninger and R. Ammann (2005). "Impact of etiology on the painful early stage of chronic pancreatitis: a long-term prospective study." Z Gastroenterol **43**(12): 1293-1301.
- Narita, M., A. Usui, M. Narita, K. Niikura, H. Nozaki, J. Khotib, Y. Nagumo, Y. Yajima and T. Suzuki (2005). "Protease-activated receptor-1 and platelet-derived growth factor in spinal cord neurons are implicated in neuropathic pain after nerve injury." J Neurosci **25**(43): 10000-10009.
- Neoptolemos, J. P., J. A. Dunn, D. D. Stocken, J. Almond, K. Link, H. Beger, C. Bassi, M. Falconi, P. Pederzoli and C. Dervenis (2001). "Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: a randomised controlled trial." The Lancet **358**(9293): 1576-1585.
- Neoptolemos, J. P., D. D. Stocken, H. Friess, C. Bassi, J. A. Dunn, H. Hickey, H. Beger, L. Fernandez-Cruz, C. Dervenis, F. Lacaine, M. Falconi, P. Pederzoli, A. Pap, D. Spooner, D. J. Kerr, M. W. Buchler and C. European Study Group for Pancreatic (2004). "A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer." N Engl J Med **350**(12): 1200-1210.
- Nishiharu, T., Y. Yamashita, Y. Abe, K. Mitsuzaki, T. Tsuchigame, Y. Nakayama and M. Takahashi (1999). "Local extension of pancreatic carcinoma: assessment with thin-section helical CT versus with breath-hold fast MR imaging--ROC analysis." Radiology **212**(2): 445-452.
- Odaira, C., Z. Berger, J. L. Iovanna and H. Sarles (1986). "Localized necrohemorrhagic pancreatitis in the rat after pancreatic interstitial trypsin injection. Regressive pseudochronic lesions." Digestion **34**(2): 68-77.
- Oettle, H., S. Post, P. Neuhaus, K. Gellert, J. Langrehr, K. Ridwelski, H. Schramm, J. Fahlke, C. Zuelke, C. Burkart, K. Gutberlet, E. Kettner, H. Schmalenberg, K. Weigang-Koehler, W. O. Bechstein, M. Niedergethmann, I. Schmidt-Wolf, L. Roll, B. Doerken and H. Riess (2007). "Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial." JAMA **297**(3): 267-277.
- Okusaka, T., S. Okada, H. Ueno, M. Ikeda, K. Shimada, J. Yamamoto, T. Kosuge, S. Yamasaki, N. Fukushima and M. Sakamoto (2001). "Abdominal pain in patients with resectable pancreatic cancer with reference to clinicopathologic findings." Pancreas **22**(3): 279-284.
- Oliveira, S. M., C. R. Silva and J. Ferreira (2013). "Critical role of protease-activated receptor 2 activation by mast cell tryptase in the development of postoperative pain." Anesthesiology **118**(3): 679-690.
- Pandol, S. J. and M. Raraty (2007). "Pathobiology of alcoholic pancreatitis." Pancreatology **7**(2-3): 105-114.
- Pedrazzoli, S., V. DiCarlo, R. Dionigi, F. Mosca, P. Pederzoli, C. Pasquali, G. Kloppel, K. Dhaene and F. Michelassi (1998). "Standard versus extended lymphadenectomy associated with pancreatoduodenectomy in the surgical treatment of adenocarcinoma of the head of the pancreas: a multicenter, prospective, randomized study. Lymphadenectomy Study Group." Ann Surg **228**(4): 508-517.
- Pezzilli, R. (2009). "Etiology of chronic pancreatitis: has it changed in the last decade?" World J Gastroenterol **15**(38): 4737-4740.
- Phoa, S. S., E. H. Tillemans, O. M. van Delden, P. M. Bossuyt, D. J. Gouma and J. S. Lameris (2005). "Value of CT criteria in predicting survival in patients with potentially resectable pancreatic head carcinoma." J Surg Oncol **91**(1): 33-40.
- Poole, D. P., S. Amadesi, N. A. Veldhuis, F. C. Abogadie, T. Lieu, W. Darby, W. Liedtke, M. J. Lew, P. McIntyre and N. W. Bunnett (2013). "Protease-activated receptor 2 (PAR2) protein and

- transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) protein coupling is required for sustained inflammatory signaling." *J Biol Chem* **288**(8): 5790-5802.
- Prat, F., O. Chapat, B. Ducot, T. Ponchon, J. Fritsch, A. D. Choury, G. Pelletier and C. Buffet (1998). "Predictive factors for survival of patients with inoperable malignant distal biliary strictures: a practical management guideline." *Gut* **42**(1): 76-80.
- Ralainirina, N., N. H. Brons, W. Ammerlaan, C. Hoffmann, F. Hentges and J. Zimmer (2010). "Mouse natural killer (NK) cells express the nerve growth factor receptor TrkA, which is dynamically regulated." *PLoS One* **5**(12): e15053.
- Raychaudhuri, S. P., S. K. Raychaudhuri, K. R. Atkuri, L. A. Herzenberg and L. A. Herzenberg (2011). "Nerve growth factor: A key local regulator in the pathogenesis of inflammatory arthritis." *Arthritis Rheum* **63**(11): 3243-3252.
- Riediger, H., F. Makowiec, E. Fischer, U. Adam and U. T. Hopt (2006). "Postoperative morbidity and long-term survival after pancreaticoduodenectomy with superior mesenterico-portal vein resection." *J Gastrointest Surg* **10**(8): 1106-1115.
- Rosso, E., N. Alexakis, P. Ghaneh, M. Lombard, H. L. Smart, J. Evans and J. P. Neoptolemos (2003). "Pancreatic pseudocyst in chronic pancreatitis: endoscopic and surgical treatment." *Dig Surg* **20**(5): 397-406.
- Sarles, H. (1986). "Etiopathogenesis and definition of chronic pancreatitis." *Dig Dis Sci* **31**(9 Suppl): 91S-107S.
- Sarles, H., J. P. Bernard and C. Johnson (1989). "Pathogenesis and epidemiology of chronic pancreatitis." *Annu Rev Med* **40**: 453-468.
- Scholz, J. and C. J. Woolf (2007). "The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia." *Nat Neurosci* **10**(11): 1361-1368.
- Seiler, C. A., M. Wagner, T. Bachmann, C. A. Redaelli, B. Schmied, W. Uhl, H. Friess and M. W. Buchler (2005). "Randomized clinical trial of pylorus-preserving duodenopancreatectomy versus classical Whipple resection-long term results." *Br J Surg* **92**(5): 547-556.
- Seiler, C. A., M. Wagner, C. Sadowski, C. Kulli and M. W. Buchler (2000). "Randomized prospective trial of pylorus-preserving vs. Classic duodenopancreatectomy (Whipple procedure): initial clinical results." *J Gastrointest Surg* **4**(5): 443-452.
- Sener, S. F., A. Fremgen, H. R. Menck and D. P. Winchester (1999). "Pancreatic cancer: a report of treatment and survival trends for 100,313 patients diagnosed from 1985-1995, using the National Cancer Database." *J Am Coll Surg* **189**(1): 1-7.
- Shanahan, F., J. A. Denburg, J. Fox, J. Bienenstock and D. Befus (1985). "Mast cell heterogeneity: effects of neuroenteric peptides on histamine release." *J Immunol* **135**(2): 1331-1337.
- Shore, S., M. G. Raraty, P. Ghaneh and J. P. Neoptolemos (2003). "Review article: chemotherapy for pancreatic cancer." *Aliment Pharmacol Ther* **18**(11-12): 1049-1069.
- Siegel, R., D. Naishadham and A. Jemal (2012). "Cancer statistics, 2012." *CA Cancer J Clin* **62**(1): 10-29.
- Somogyi, L., S. O. Ross, M. Cintron and P. P. Toskes (2003). "Comparison of biologic porcine secretin, synthetic porcine secretin, and synthetic human secretin in pancreatic function testing." *Pancreas* **27**(3): 230-234.
- Spinnler, K., T. Frohlich, G. J. Arnold, L. Kunz and A. Mayerhofer (2011). "Human tryptase cleaves pro-nerve growth factor (pro-NGF): hints of local, mast cell-dependent regulation of NGF/pro-NGF action." *J Biol Chem* **286**(36): 31707-31713.
- Steinhoff, M., N. Vergnolle, S. H. Young, M. Tognetto, S. Amadesi, H. S. Ennes, M. Trevisani, M. D. Hollenberg, J. L. Wallace, G. H. Caughey, S. E. Mitchell, L. M. Williams, P. Geppetti, E. A. Mayer and N. W. Bunnett (2000). "Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism." *Nat Med* **6**(2): 151-158.
- Stempelj, M. and I. Ferjan (2005). "Signaling pathway in nerve growth factor induced histamine release from rat mast cells." *Inflamm Res* **54**(8): 344-349.

- Strouch, M. J., E. C. Cheon, M. R. Salabat, S. B. Krantz, E. Gounaris, L. G. Melstrom, S. Dangi-Garimella, E. Wang, H. G. Munshi, K. Khazaie and D. J. Bentrem (2010). "Crosstalk between mast cells and pancreatic cancer cells contributes to pancreatic tumor progression." Clin Cancer Res **16**(8): 2257-2265.
- Tamura, R., T. Ishibashi and S. Takahashi (2006). "Chronic pancreatitis: MRCP versus ERCP for quantitative caliber measurement and qualitative evaluation." Radiology **238**(3): 920-928.
- Tancowny, B. P., V. Karpov, R. P. Schleimer and M. Kulka (2010). "Substance P primes lipoteichoic acid- and Pam3CysSerLys4-mediated activation of human mast cells by up-regulating Toll-like receptor 2." Immunology **131**(2): 220-230.
- Tran, K. T. C., H. G. Smeenk, C. H. J. van Eijck, G. Kazemier, W. C. Hop, J. W. G. Greve, O. T. Terpstra, J. A. Zijlstra, P. Klinkert and H. Jeekel (2004). "Pylorus Preserving Pancreaticoduodenectomy Versus Standard Whipple Procedure." Annals of Surgery **240**(5): 738-745.
- Treede, R. D., T. S. Jensen, J. N. Campbell, G. Cruccu, J. O. Dostrovsky, J. W. Griffin, P. Hansson, R. Hughes, T. Nurmikko and J. Serra (2008). "Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes." Neurology **70**(18): 1630-1635.
- Tseng, J. F., C. P. Raut, J. E. Lee, P. W. Pisters, J. N. Vauthey, E. K. Abdalla, H. F. Gomez, C. C. Sun, C. H. Crane, R. A. Wolff and D. B. Evans (2004). "Pancreaticoduodenectomy with vascular resection: margin status and survival duration." J Gastrointest Surg **8**(8): 935-949; discussion 949-950.
- Umehara, H., E. T. Bloom, T. Okazaki, Y. Nagano, O. Yoshie and T. Imai (2004). "Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(1): 34-40.
- van Diest, S. A., O. I. Stanisor, G. E. Boeckxstaens, W. J. de Jonge and R. M. van den Wijngaard (2012). "Relevance of mast cell-nerve interactions in intestinal nociception." Biochim Biophys Acta **1822**(1): 74-84.
- Verge, G. M., E. D. Milligan, S. F. Maier, L. R. Watkins, G. S. Naeve and A. C. Foster (2004). "Fractalkine (CX3CL1) and fractalkine receptor (CX3CR1) distribution in spinal cord and dorsal root ganglia under basal and neuropathic pain conditions." Eur J Neurosci **20**(5): 1150-1160.
- Wagner, M., C. Redaelli, M. Lietz, C. A. Seiler, H. Friess and M. W. Buchler (2004). "Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma." Br J Surg **91**(5): 586-594.
- Warshaw, A. L. and C. Fernandez-del Castillo (1992). "Pancreatic carcinoma." N Engl J Med **326**(7): 455-465.
- Whitcomb, D. C. (2004). "Mechanisms of disease: Advances in understanding the mechanisms leading to chronic pancreatitis." Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol **1**(1): 46-52.
- Whitcomb, D. C., M. C. Gorry, R. A. Preston, W. Furey, M. J. Sossenheimer, C. D. Ulrich, S. P. Martin, L. K. Gates, Jr., S. T. Amann, P. P. Toskes, R. Liddle, K. McGrath, G. Uomo, J. C. Post and G. D. Ehrlich (1996). "Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene." Nat Genet **14**(2): 141-145.
- Witt, H., M. V. Apte, V. Keim and J. S. Wilson (2007). "Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy." Gastroenterology **132**(4): 1557-1573.
- Wong, G. Y., D. R. Schroeder, P. E. Carns, J. L. Wilson, D. P. Martin, M. O. Kinney, C. B. Mantilla and D. O. Warner (2004). "Effect of neurolytic celiac plexus block on pain relief, quality of life, and survival in patients with unresectable pancreatic cancer: a randomized controlled trial." JAMA **291**(9): 1092-1099.
- Yadav, D., R. H. Hawes, R. E. Brand, M. A. Anderson, M. E. Money, P. A. Banks, M. D. Bishop, J. Baillie, S. Sherman, J. DiSario, F. R. Burton, T. B. Gardner, S. T. Amann, A. Gelrud, C. Lawrence, B. Elinoff, J. B. Greer, M. O'Connell, M. M. Barmada, A. Slivka, D. C. Whitcomb

- and G. North American Pancreatic Study (2009). "Alcohol consumption, cigarette smoking, and the risk of recurrent acute and chronic pancreatitis." Arch Intern Med **169**(11): 1035-1045.
- Yadav, D. and D. C. Whitcomb (2010). "The role of alcohol and smoking in pancreatitis." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **7**(3): 131-145.
- Ying, J. E., L. M. Zhu and B. X. Liu (2012). "Developments in metastatic pancreatic cancer: is gemcitabine still the standard?" World J Gastroenterol **18**(8): 736-745.
- Yoneda, O., T. Imai, S. Goda, H. Inoue, A. Yamauchi, T. Okazaki, H. Imai, O. Yoshie, E. T. Bloom, N. Domae and H. Umehara (2000). "Fractalkine-mediated endothelial cell injury by NK cells." J Immunol **164**(8): 4055-4062.
- Zhang, W., J. Gao, T. Zhao, L. Wei, W. Wu, Y. Bai, D. Zou and Z. Li (2011). "Proteinase-activated receptor 2 mediates thermal hyperalgesia and is upregulated in a rat model of chronic pancreatitis." Pancreas **40**(2): 300-307.
- Zhang, Y., A. E. Frampton, C. Kyriakides, J. J. Bong, N. Habib, R. Ahmad and L. R. Jiao (2012). "Loco-recurrence after resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas: predictors and implications for adjuvant chemoradiotherapy." J Cancer Res Clin Oncol **138**(6): 1063-1071.
- Zhu, Y., T. Colak, M. Shenoy, L. Liu, R. Pai, C. Li, K. Mehta and P. J. Pasricha (2011). "Nerve growth factor modulates TRPV1 expression and function and mediates pain in chronic pancreatitis." Gastroenterology **141**(1): 370-377.
- Zhu, Z., H. Friess, F. F. diMola, A. Zimmermann, H. U. Graber, M. Korc and M. W. Buchler (1999). "Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer." J Clin Oncol **17**(8): 2419-2428.
- Zhu, Z., J. Kleeff, H. Kaye, L. Wang, M. Korc, M. W. Buchler and H. Friess (2002). "Nerve growth factor and enhancement of proliferation, invasion, and tumorigenicity of pancreatic cancer cells." Mol Carcinog **35**(3): 138-147.

8. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name:	Stephan Schorn
Geboren:	24. Oktober 1984
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Eltern:	Martina Schorn Bernhard Schorn (verst. 1999)
Geschwister:	Andreas Schorn Simone Beatrice Schorn

Ausbildung, Weiterbildung und berufliche Tätigkeit

1991 – 1995	Grundschule „In den Bruchwiesen“ in Saarlouis
1995 – 2004	Albert-Schweizer-Gymnasium in Dillingen
2004	Abitur
2004-2005	Ersatzdienst in der Rettungswache Dillingen/Saar
09. 2005 – 06.2007	1. Abschnitt der Medizinischen Prüfung an der Universität Pécs/Fünfkirchen in Ungarn
02.2008 – 04.2008	Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thiel "The influence of thapsigargin for apoptosis especially on Caspase and p53 activation"
04.2008 – 11.2012	2. Abschnitt der Medizinischen Prüfung am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
03.2009 – 12.2011	Promotion in der AG Saur in der 2. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar der TU München
01.2012 – 03.2013	Promotion in der AG „Pancreatic Neuropathy and Pain“ unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. Güralp Ceyhan
Seit 12.2012	Approbation

9. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Priv.-Doz. Dr. Güralp O. Ceyhan bedanken. Seit meinem 1. Tag im Praktischen Jahr hast du mich stets gefordert und gefördert, wo du konntest. Du hast dir immer Zeit genommen und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden, um mich sowohl in der Wissenschaft als auch in der Klinik auszubilden und mich im Erreichen meiner Ziele zu unterstützen. Vielen Dank für die großzügige und liebevolle Unterstützung während meiner Zeit in der Klinik und im Labor und noch weit darüber hinaus!

Auch allen Mitgliedern der AG Ceyhan möchte ich Danke sagen. Vielen Dank an Ulrike Bourquain für die herzliche Aufnahme und Einweisung ins Labor und auch für die gute Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt auch Dr. med. I. Ekin Demir. Deine außergewöhnlich gute Betreuung während meiner Doktorarbeit im Labor und darüber hinaus war für mich sehr wichtig – du hast mir dort weitergeholfen, wo ich keine Lösung fand. Du hast nicht nur im Labor jederzeit ein offenes Ohr für Probleme und Schwierigkeiten: Es war und ist mir ein Vergnügen, mit dir zusammenzuarbeiten.

Vielen Dank auch an alle meine Freunde, die mich durch das Medizinstudium begleitet haben, mir zur Seite standen und auf deren Rat ich mich immer verlassen kann.

Der Großteil meines Dankes geht an meine Familie, die es mir ermöglicht hat, Medizin zu studieren: Danke an meine Oma Toni und meine Tante Hannelore für die liebevolle Unterstützung während des Studiums, Danke an meinen Bruder Andreas, der mich über das komplette Medizinstudium begleitet hat und natürlich vielen Dank an meine Mutter Martina und meine Schwester Simone, die mir beide durch schwere Zeiten geholfen haben, jederzeit für mich erreichbar sind und Zeit für meine Probleme haben!